

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 15/62, C07K 14/47, C12P 21/02, C12N 1/21, A61K 38/16</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/42319</p> <p>(43) 国際公開日 1997年11月13日(13.11.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01502</p> <p>(22) 国際出願日 1997年5月1日(01.05.97)</p> <p>(36) 優先権データ 特願平8/135760 1996年5月2日(02.05.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP) 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE)[JP/JP] 〒565 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 中村範夫(NAKAMURA, Norio)[JP/JP] 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo, (JP) 長田重一(NAGATA, Shigekazu)[JP/JP] 〒565 大阪府吹田市佐井寺2丁目21-17-511 Osaka, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.) 〒101 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号 千代田岩本ビル4階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, NO, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL Fas ANTIGEN DERIVATIVES</p> <p>(54)発明の名称 新規Fas抗原誘導体</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Novel Fas antigen derivatives characterized by containing at least part or the whole of a Fas antigen extracellular region polypeptide which is deficient in at least one of the amino acid residues (except for the cystein residue concerned) ranging from the N-terminal amino acid residue of a Fas antigen polypeptide to the cystein residue that is closest to the N-terminus; a DNA coding for the Fas antigen derivatives; a recombinant DNA molecule containing the sequence of the above DNA; a transformant containing the recombinant DNA molecule introduced therein; processes for producing the Fas antigen derivatives; medicines containing the novel Fas antigen derivatives as the active ingredient; and methods of improving the activities and functions of the Fas antigen and so forth.</p>		

(57) 要約

F a s 抗原ポリペプチドのN末端アミノ酸残基から最もN末端よりのシステイン残基までのアミノ酸残基（該システイン残基は除く）のうち少なくとも1つのアミノ酸残基が欠失したF a s 抗原細胞外領域ポリペプチドの一部または全部を、少なくとも含有することを特徴とする新規F a s 抗原誘導体、および該F a s 抗原誘導体をコードするDNA、該DNA配列を含有する組み換えDNA分子、該組み換えDNA分子を導入した形質転換体、さらに該F a s 抗原誘導体の製造方法、また該新規F a s 抗原誘導体を有効成分として含有する医薬、F a s 抗原等の活性・機能を改良する方法を提供する。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロバキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	IN	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

明細書

発明の名称

新規 Fas 抗原誘導体

技術分野

- 5 本発明は、活性等が改良された新規 Fas 抗原誘導体およびそれをコードする新規な DNA を医薬の分野に提供する。本発明は、また、当該 DNA を含む組換え DNA 分子、形質転換体、および当該新規 Fas 抗原誘導体の製造方法をも提供する。

背景技術

- 10 ヒト Fas 抗原は、様々な細胞の表面に存在するポリペプチドであって、アポトーシスと呼ばれる細胞の死と関連していると考えられている。生体の恒常性は細胞の増殖と分化およびその死によって巧妙に制御されているが、アポトーシスは、死につつある細胞の形態からネクローシス（壊死）と区別される細胞の死の 1 形態である。生体の恒常性を維持するための細胞の死、すなわち、生体にとつ
- 15 て不必要な細胞を除去したり、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞が細胞障害性 T 細胞（CTL）やナチュラルキラー（NK）細胞によって攻撃され、除去される場合の細胞の死は、主としてアポトーシスによることがわかっている。

元々、ヒト線維芽細胞でマウスを免疫して得られたモノクローナル抗体であり、ある種の細胞にアポトーシスを誘導する抗 Fas 抗体（ヨネハラ S.

- 20 （Yonehara S.）等、J. Exp. Med.、169 巻、1747-

1756頁、1989年)によって認識され、アポトーシスのシグナルを細胞に伝達する細胞表面抗原としてヨネハラ S. (Yonehara S.) 等が見出したFas抗原が、いかなるものであるかは長年不明であった。

- 近年、Fas抗原遺伝子がクローニングされ、Fas抗原は分子量約45kDのI型細胞膜貫通型糖蛋白質であり、そのアミノ酸配列から生理学的に重要な細胞表面膜タンパク質群を構成するNGFR(神経成長因子レセプター)/TNFR(TNFRレセプター)ファミリーに属することが判明した(イトウ N. (Itoh N.) 等Cell, 66巻、233-243頁、1991年)。また、マウスFas抗原遺伝子もクローニングされ(ワタナベ・フクナガ R. (Watanabe-Fukunaga R.) 等、J. Immunol., 148巻、1274-1279頁、1992年)、Fas抗原mRNAが、マウスの胸腺、肝、肺、心臓、卵巣で発現していることが確認された。ヒトにおいても、リンパ球、肝細胞、小腸上皮細胞、皮膚ケラチノサイト及び骨芽細胞等の様々な組織や細胞で発現することが報告されている(Leithauser, F. 等、Lab. Invest., 69巻、415-429頁、1993年)。

本来細胞表面上に存在すると推定されていたFas抗原が血中や培養上清中にも検出され、可溶型Fas抗原(sFas)としても存在することが判明し、それらの生理的機能等についても関心が高まりつつある。

- 20 Cheng J. 等(Science, 263巻、1759-1762頁、1994年)は、アルタネイティブスプライシングにより第IVエクソン(細胞外領域14塩基対及び細胞膜貫通領域49塩基対に対応)を欠き、分泌型分子

- をコードすると考えられる可溶型の Δ TM型Fas抗原をコードするmRNAが存在すること、全身性エラテマトーデス（SLE）患者血清中において可溶型Fas抗原が高濃度であったこと、マウスFas抗原の細胞外領域とヒトIgGFc部分とからなるキメラ分子をマウスに投与した結果、脾細胞数の増加
- 5 とともに自己リンパ球混合反応の上昇が認められたことを報告した。また、Cascino I. 等（J. Immunol.、154巻、2706－2713頁、1995年）も同様なFas抗原mRNAを含めて少なくとも3種のFas抗原をコードするmRNAが存在することを報告した。それらの生理的機能や発現部位等については不明であるが、組み換え Δ TM型Fas抗原は
- 10 Fasリガンドの細胞障害活性を濃度依存的に抑制すること、健常人及びSLE患者血清中に存在する可溶型Fas抗原の大部分はスプライシングバリエントがコードする Δ TM型Fas抗原であることが示されている（カヤガキ N.（Kayagaki N.）等、医学のあゆみ、174巻、1136－1140、1995年）。
- 15 さらに、最近キムラ K.（Kimura K.）等は、ラットFas抗原遺伝子をクローニングするとともに、ラット肝mRNA中にアルタネイティブスプライシングの相違により2種類のFas抗原mRNAが検出されること、及び膜結合型Fas抗原のmRNA以外に分子量の小さなペプチドをコードするmRNAがあることを報告し（Biochemical and
- 20 Biophysical Research Communications、198巻（2）、666－674頁、1994年）、また、対応するヒトFas抗原の変異体（バリエント）も単離、同定した（特開平7－289266号

公報)。

一方、ヒトFasリガンドは、Fas抗原を発現する細胞に対してアポトーシスを誘導する生体内分子として、長田等により報告されたポリペプチドである(Tomohiro Takahashi等、International
5 Immunology、6巻、1567-1574頁、1994年)。ヒトFasリガンドは、TNFファミリーに属する分子量約40kDのII型膜蛋白質で、TNFと同様に、生体内で3量体を形成すると考えられている(Masato Tanaka等、EMBO Journal、14巻、
1129-1135頁、1995年)。また、ヒトFasリガンドはラット
10 Fasリガンド(Takashi Suda等、Cell、75巻、1169-1178頁、1993年)やマウスFasリガンド(Tomohiro Takahashi等、Cell、76巻、969-976頁、1994年)と細胞外領域において高いホモロジーを有しており、ヒトFasリガンドはヒトFas抗原のみでなくマウスFas抗原をも認識し、アポトーシスを誘導する
15 ことができる。逆に、ラットFasリガンドおよびマウスFasリガンドも、ヒトFas抗原を認識してアポトーシスを誘導することができる。

もともと細胞のアポトーシスという現象は、生体の恒常性の維持に深い関わりをもつものとして注目されていたが、上記のようにFas抗原およびFasリガンドが異なる種間でホモロジーを有し構造的および作用的にも保存されているこ
20 とから、Fasリガンド-Fas抗原を介したアポトーシスは生体の恒常性の維持に極めて重要な役割を担っているものと考えられる。

特に最近、Fasリガンド、Fas抗原の異常と自己免疫疾患との関係について

て興味ある報告がなされた。すなわち、自己免疫疾患のモデルマウスの1系統であるMRL-lpr/lprではFas抗原遺伝子に変異が生じており、このような変異の生じたFas抗原遺伝子を発現している細胞ではアポトーシスが起きない(Rie Watanabe-Fukunaga等、Nature、356
5 巻、314-317頁、1993年およびAdachi M. 等、Proc.
Nat l. Acad. Sci. USA、90巻、1993年)。一方、自己免疫疾患のモデルマウスの他の系統であるC3H-gld/gldでは、Fasリガ
ンド遺伝子に変異が生じており、gldマウスのFasリガンドはアポトーシス
誘導活性を持たない。この変異とは、遺伝子のポイントミューテーションで
10 あり、その結果、Fasリガンドの細胞外領域のC末端より数えて7番目のアミ
ノ酸が他のアミノ酸に変化している。(Tomohiro Takahashi
等、Cell、76巻、969-976頁、1994年)。このようなgldマ
ウスのFasリガンドは、Fas抗原に結合することができない(Fred
Ramsdell等、Eur. J. Immunol、24巻、928-933
15 頁、1994年)。

また、SLE患者では血中の可溶型Fas抗原の上昇(Cheng J.
等、Science、263巻、1759-1762頁、1994年)やリンパ球表面のFas抗原の発現の上昇が報告されている(アマサキ Y.
(Amasaki Y.) 等、Clin. Exp. Immunol. 99
20 巻、245-250頁、1995年)他、リンパ球増殖症候群においても、Fas
抗原の発現および機能異常を伴うFas抗原遺伝子の異常が関与している可能性が示唆されている(Rieux Laucaat F. 等、Science、2

68巻、1347-1349頁、1995年およびFisher G. H. 等、
Cell、81巻、935-946頁、1995年）。

これらの事実から、ヒトにおける自己免疫疾患のある種のは、Fas抗原
もしくはFasリガンドの異常によって、本来アポトーシスを起こして生体内か
5 ら除去されるべき自己反応性のT細胞が残存するために生じるのであらうと考え
られるようになった。

最近では、関節リウマチにおける滑膜細胞の異常増殖や関節破壊も、これらの
細胞で正常にアポトーシスが生じないために起こるのではないかと考えられてい
る。また、コバヤシ N. 等は、エイズウイルス感染によりT細胞膜上にFas
10 抗原の発現が誘導されるので（日経サイエンス、6巻、34-41頁、1993
年）、エイズウイルス感染時におけるT細胞の減少もFasリガンドを介したも
のであると予想している。

また、ウイルス性の劇症肝炎等においてもFasリガンドによるアポトーシス
の関与が示唆されている（ナガタ S. 等、Immunol. Today、16
15 巻、39-43頁、1995年）。このようにFas抗原を介したアポトーシス
と疾患との関わりが明らかになるにつれて、アポトーシスの異常を伴う疾患、す
なわち、上記自己免疫疾患やリウマチ、エイズ等の治療に、Fasリガンドもし
しくはFas抗原を応用することが期待されてきている。

現在のところ、Fas抗原を介したアポトーシスを抑制する物質としては、例
20 えば、 Δ TM型Fas抗原、およびFas抗原の細胞外領域と免疫グロブリン
G (IgG) のFc領域との融合蛋白質、ならびに抗Fas抗体の断片
(Dhein J. 等、Nature、373巻、438-441頁、1995

年) 及び抗F a s アンタゴニスト抗体等が報告されている (A l d e r s o m M. A. 等、Int. Immunol. 6巻、1799-1806頁、1994年)。

また、長田らは、F a s リガンドに対する抗体を取得し、該抗体がアポトーシ
5 スを抑制しうることを報告してきた (M a s a t o T a n a k a 等、EMBO Journal, 14巻、1129-1135頁、1995年および国際特許出願公開公報WO95/13293)。

上記したように、F a s 抗原が単離され、生体内でF a s 抗原を介してア
ポトーシスが惹起されること、およびF a s 抗原を介したアポトーシスが種々の
10 疾患と関連していることが明らかにされつつあることから、F a s 抗原を介した
アポトーシスを調節する物質は、アポトーシスが関与すると予想される疾患の予
防及び治療ならびに診断において有用であると考えられている。医薬品の生体内
での有用性は、活性、体内動態、安定性、副作用等を総合的に考慮しなければな
らないが、特に活性の高い物質は生体内においても低用量で有効性を発揮すると
15 期待され、産業上の有用性が高い。その意味からも、改良された新規F a s 抗原
誘導体、特により活性の高いF a s 抗原誘導体およびその特性の解明が望まれて
おり、特にヒトの治療等の生体内における適用を考慮した場合、より低用量
でF a s 抗原を介したアポトーシスを調節しうる新規F a s 抗原誘導体が有効性
および安全性の面から望まれている。

20 また、F a s 抗原とF a s リガンドとの相互作用、F a s 抗原を介したア
ポトーシスのメカニズム等の解明のためにも新規F a s 抗原誘導体の取得は重要
である。

ポリペプチドはその活性部位の構造が保存されていれば、そのポリペプチドの一部であっても活性を有しているものが知られている。しかし、一方では、ポリペプチド中のアミノ酸1個の変異または欠失であってもそのポリペプチドの活性を変化させ極端な場合には失わせる場合も多く知られている。

- 5 本発明の目的は、活性等が改良された新規 F a s 抗原誘導体およびそれをコードする新規な DNA を医薬の分野に提供することにある。本発明は、また、当該 DNA を含む組換え DNA 分子および形質転換体、ならびに当該新規 F a s 抗原誘導体の製造方法をも提供する。

発明の開示

- 10 上記したような状況の中で、本発明者等は、F a s 抗原の特定の数の N 末端領域のアミノ酸残基を欠失させた新規 F a s 抗原誘導体が、従来の F a s 抗原または F a s 抗原誘導体に比して活性または機能が向上していることを見出し、鋭意努力の末、本発明を完成させたものである。

- すなわち、本発明の第 1 の態様は新規な F a s 抗原誘導体を提供し、少なくとも
- 15 も、F a s 抗原ポリペプチドの N 末端アミノ酸残基から最も N 末端よりのシステイン残基までのアミノ酸残基（該システイン残基は除く）のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基が欠失した F a s 抗原細胞外領域ポリペプチドの一部または全部を、少なくとも含有することを特徴とする新規 F a s 抗原誘導体を提供する。このうち、配列表の配列番号 15 の N 末端から数えて 1 ～ 42 番目のアミノ酸残基
- 20 のうち少なくとも 1 つが欠失した F a s 抗原細胞外領域ポリペプチドの一部または全部を含有する新規 F a s 抗原誘導体、このうち、欠失したアミノ酸残基数が

29以上である新規F a s抗原誘導体、特に欠失したアミノ酸残基数が29である新規F a s抗原誘導体を提供する。

また、F a s抗原の1または2以上の部分からなる上記新規F a s抗原変異体ならびに少なくとも新規F a s抗原変異体のいずれかおよび他の（ポリ）ペプチドを含む、特に、新規F a s抗原誘導体のC末端側に下記aおよびbからなる群から選択される少なくとも1つの（ポリ）ペプチドを含む融合ポリペプチドである新規F a s抗原誘導体を提供する。

a. イムノグロブリンのヒンジ領域の1部または全部。

b. イムノグロブリンのF c断片の1部または全部。

10 また、前記新規F a s抗原誘導体の多量体である新規F a s抗原誘導体を提供する。

また、本発明の第2の態様は前記新規F a s抗原誘導体をコードするDNA配列を含むことを特徴とするDNA、とりわけ配列表の配列番号12～14に記載のDNA配列を含むDNAを提供する。

15 さらに、本発明の第3の態様は、該DNAの塩基配列を含むことを特徴とする組み換えDNA分子を提供する。

次いで、本発明の第4の態様は、前記新規組み換えDNA分子で形質転換されたことを特徴とする形質転換体を提供する。

本発明の第5の態様は、前記の新規F a s抗原誘導体の製造方法のうち、前記形質転換体を培養し、該培養混合物から新規F a s抗原誘導体を回収、精製する工程を含むことを特徴とする前記新規F a s抗原誘導体の製造方法を提供する。

本発明の第 6 の態様は、第 1 の態様の新規 F a s 抗原誘導体またはその生理的に許容されうる塩を有効成分として含有する医薬を提供する。

本発明の第 7 の態様は、F a s 抗原の N 末端アミノ酸残基から最も N 末端よりのシステイン残基までのアミノ酸残基（該システイン残基は除く）のうち少なくとも 5 とも 1 つを欠失させることを特徴とする、F a s 抗原または F a s 抗原誘導体の活性または機能を改良する方法を提供する。

ところで、公知のヒト F a s 抗原は、図 1、2 に示したような c D N A 配列（配列番号 1 6）およびそれより推定されるアミノ酸配列を含有する。そして、そのアミノ酸配列より、1 6 残基からなるシグナルペプチドが切断され、
10 3 1 9 アミノ酸からなる I 型の細胞膜貫通型蛋白質として存在すること、ならびに 1 5 7 アミノ酸の細胞外領域（1 - 1 5 7 残基目）、1 7 アミノ酸の膜貫通領域（1 5 8 - 1 7 4 残基目）および 1 4 5 アミノ酸の細胞内領域（1 7 5 - 3 1 9 残基目）を有するものと推定されている。ヒト F a s 抗原の細胞外領域は、F a s リガンドと結合する機能を有するが、細胞外領域のみを発現させた
15 ポリペプチドは、可溶型として存在し、F a s リガンドと結合することによりアポトーシス抑制活性を有する。また、後に詳述する本発明者などのコンピュータ解析によれば N 末端から数えて 4 3 番目のシステイン残基は他のアミノ酸残基と何らかの結合を形成している可能性があり、F a s リガンドとの結合に必要な、F a s 抗原細胞外領域のドメイン構造の保持に寄与していると考えら
20 れる。一方 F a s 抗原細胞外領域の最も C 末端よりのシステイン残基も構造保持に必要と考えられるが、前述の Δ T M 型 F a s 抗原が F a s リガンドと結合することより、C 末端の 5 残基すなわち 1 5 3 番目のグリシン残基から 1 5 7 番目の

アスパラギン残基までは活性に必要ないと予測される。

図面の簡単な説明

図 1 はヒト Fas 抗原をコードする DNA の塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である。*印は可能な N-グリコシレーションサイ

5 トを、また、下線部は予想される細胞膜貫通領域を示す。

図 2 はヒト Fas 抗原をコードする DNA の塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である。*印は可能な N-グリコシレーションサイトを、また、下線部は予想される細胞膜貫通領域を示す。

図 3 は本発明の第 1 の態様の新規 Fas 抗原誘導体の一つである sh
10 Fas (nd 2 9) をコードする cDNA の塩基配列 (配列番号 1 7) を含むベクター中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である。*印は可能な N-グリコシレーションサイトを示す。

図 4 は本発明の第 1 の態様の新規 Fas 抗原誘導体の一つである sh Fas
s (nd 2 9) - Fc をコードする cDNA の塩基配列 (配列番号 1 8) を含む
15 ベクター中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である。*印は可能な N-グリコシレーションサイトを示す。

図 5 は本発明の第 1 の態様の新規 Fas 抗原誘導体の一つである sh Fas
s (nd 2 9) - hinge をコードする cDNA の塩基配列 (配列番号 1 9)
を含むベクター中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す
20 図である。*印は可能な N-グリコシレーションサイトを示す。

図 6 は sh Fas (nd 2 9) - Fc および h Fas - Fc のゲル電気泳動を

示す図面代用写真である。

図7はゲル濾過クロマトグラフィー前のshFas(nd29)-hingeのゲル電気泳動を示す図面代用写真である。

図8はゲル濾過クロマトグラフィー後のshFas(nd29)-hinge
5 のゲル電気泳動を示す図面代用写真である。

図9はhFas-FcおよびshFas(nd29)-Fcのアポトーシス抑制作用を示す図である。

図10はhFas-FcおよびshFas(nd29)-Fcの細胞アポトーシス抑制作用を示す図である。

10 図11はhFas-FcおよびshFas(nd29)-hingeの細胞アポトーシス抑制作用を示す図である。

図12はhFas-FcおよびshFas(nd29)-hingeの細胞アポトーシス抑制作用を示す図である。

図13の(a)～(d)はhFas-FcおよびshFas(nd29)-FcのGOTおよびGPT上昇抑制作用を示す図である。
15

図14の(a)～(d)はhFas-FcおよびshFas(nd29)-hingeのGOTおよびGPT上昇抑制作用を示す図である。

図15の(a)～(c)はヒトFas抗原、ヒトFas抗原細胞外領域(shFas)、hFas-Fc、shFas(nd29)-Fcおよび
20 shFas(nd29)-hingeのアミノ酸配列を比較した模式図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を詳細に説明する。

ここで、本発明の新規 F a s 抗原誘導体の説明において、「アミノ酸配列（または（ポリ）ペプチド等）を含有する新規ポリペプチド」とは、以下のことを意味する。第 1 は、その新規ポリペプチドがそのアミノ酸配列で規定されるものであってもよいという意味であり、第 2 は、そのアミノ酸配列に加えてそのアミノ酸配列の N 末端あるいは C 末端のいずれか一方、もしくは両方に任意の 1 つ以上のアミノ酸が付加してなるものであってもよいという意味であり、さらに新規ポリペプチドが融合ポリペプチドまたは 2 つ以上の機能的領域を含むポリペプチドである場合には、その融合点または機能的領域間に任意の 1 つ以上のアミノ酸が付加（挿入）してなるものであってもよいという意味である。

また「アミノ酸配列（または（ポリ）ペプチド等）の少なくとも一部分を含有するポリペプチド」とは、そのアミノ酸配列全体を含有する新規ポリペプチド、およびそのアミノ酸配列に含まれる任意の長さからなる任意の一部分の配列を含有するポリペプチドを意味する。

また、本発明の新規 F a s 抗原誘導体の説明においては、「F a s 抗原誘導体」または「F a s 抗原誘導体ポリペプチド」とは、少なくとも F a s 抗原の一部を含有するポリペプチドであって、F a s 抗原変異体および、F a s 抗原または F a s 抗原変異体と他の（ポリ）ペプチドとの融合ポリペプチドならびにそれらの多量体等が含まれ、（ポリ）ペプチド以外の化合物を含有するものも含まれる。

「F a s 抗原変異体」または「F a s 抗原変異体ポリペプチド」とは F a s 抗

原の一部または2つ以上の部分からなるポリペプチドであって、基本的に F a s 抗原以外に由来する（ポリ）ペプチドを含まず、F a s 抗原が有する活性または機能の少なくとも一つを有するポリペプチドであり、切断型（T r u n c a t e d）F a s 抗原およびF a s 抗原の1アミノ酸以上を欠失もしくは置換した変異体（それぞれ欠失体もしくは置換体と呼ぶことがある）等、例えばF a s 抗原細胞外領域、△T M型F a s 抗原等の膜貫通領域を欠失したF a s 抗原（F a s △T M）および細胞内領域欠失F a s 抗原等が包含される。

「融合ポリペプチド」とは、天然には存在しない組合せの2以上の（ポリ）ペプチドが、直接または間接的に、好ましくは直接的に、化学結合した、好ましくはペプチド結合したポリペプチドを意味する。

ここでF a s 抗原の「N末端領域」とは、ヒトF a s 抗原（図1、2）を例に挙げ説明すると、広義にはシグナルペプチド（図1において－16番目のM e t から－1番目のA l a）由来のアミノ酸残基も含まれるが、本発明の新規F a s 15 抗原誘導体においては、特にシグナルペプチドが除去されたF a s 抗原のN末端アミノ酸残基（A r g）をN末端とし、このN末端アミノ酸残基（A r g）より始まり最初のシステイン残基（43番目）の直前のアミノ酸残基（42番目のP h e）までの領域を意味する。

「活性または機能」とは、F a s リガンド結合活性、後述するようなアポトーシス抑制活性もしくはアポトーシス誘導活性等の生物活性、安定性、体内動態、20 または溶解性等の物理化学的性質等からもたらされる機能を含むが、その中でF a s リガンド結合活性およびアポトーシスに対する作用が好ましく、アポトーシ

ス抑制活性が特に好ましい。

また、「改良された活性または機能を有する」とは、対応するN末端領域を欠失していないポリペプチド（N末端領域非欠失体）と比較して、少なくとも一つの活性等の値が、少なくとも大であること、例えば1.4倍以上、好ましくは25倍以上、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは5倍以上、特に好ましくは10倍以上であることを意味する。活性値等の比較は、一般的な方法が用いられるが、単位量あたりの活性量、すなわち比活性で比較することができる。比活性は、通常50%阻害濃度（IC₅₀）または50%有効用量（ED₅₀）等によって求められる。

- 10 本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体は、少なくとも、Fas抗原ポリペプチドのN末端アミノ酸残基から最もN末端よりのシステイン残基までのアミノ酸残基（該システイン残基は除く）のうち少なくとも1つのアミノ酸残基が欠失したFas抗原細胞外領域ポリペプチドの一部または全部を、少なくとも含有する新規Fas抗原誘導体である。ここで上記少なくとも1つのアミノ酸残基が
- 15 欠失したFas抗原細胞外領域ポリペプチドの一部または全部および本発明の新規Fas抗原誘導体は、少なくともFasリガンドと結合する能力を有する。

上記の1個以上のアミノ酸残基を欠失させる対象となるFas抗原としては、特に由来は限定されないが、哺乳動物のFas抗原、特にヒトFas抗原、例えば図1、2に示した公知のヒトFas抗原のアミノ酸配列を含有するものが

20 よい。

アミノ酸残基を欠失させる対象となるFas抗原が図1、2に示したヒトFas抗原の場合は、本発明の新規Fas抗原誘導体は配列表の配列番号15（ヒト

F a s 抗原の細胞外領域) のN末端から数えて1~42番目のアミノ酸残基のうち少なくとも1つが欠失した新規F a s 抗原誘導体、好ましくは欠失したアミノ酸残基数が29以上であり、特に好ましくは欠失したアミノ酸残基数が29である新規F a s 抗原誘導体である。

- 5 欠失させるアミノ酸はアミノ酸配列上連続していても連続していなくてもよいが、連続している方がより好ましく、この場合、N末端側から優先的に欠失させることがより好ましい。すなわち、配列表の配列番号15のN末端から数えて第1番目から29番目までの29個のアミノ酸残基を欠失した、30番目のT h r 残基から始まる新規F a s 抗原誘導体が特に好ましい。
- 10 また、欠失させることが望ましいN末端領域のアミノ酸残基の数および位置に関しては、実施例で詳述するような、F a s 抗原細胞外領域等のコンピューターによる立体構造解析の結果を参考にすることができる。すなわち、立体構造解析においてF a s 抗原のN末端領域構造がF a s リガンドとの結合において立体障害とならないように設計することで、F a s リガンドとの結合力等を至適化また
- 15 は調節することが可能である。

また、F a s 抗原のN末端領域はその構造上の特性からプロテアーゼ等による分解を受けやすい可能性がある。また、宿主によってポリペプチドのプロセッシングが質的または量的に異なる可能性もあり、N末端領域を欠失させる場合にはこれらの点ならびに溶解性および安定性等をも考慮に入れることができる。

- 20 以上のような点を考慮すると、ヒトF a s 抗原の場合、N末端領域から欠失させることが好ましいアミノ酸残基は、好ましくは13または18以上、より好ましくは23以上、さらに好ましくは29以上であり、いずれの場合もN末端から

数えて36番目から42番目のアミノ酸残基は欠失させない方が好ましい。

また本発明の新規F a s 抗原誘導体には、N末端領域のアミノ酸残基、特にヒトF a s 抗原の場合、配列表の配列番号15のN末端から数えて1～42番目のアミノ酸残基のうち少なくとも1つが欠失したF a s 抗原細胞外領域の一部または

5 は全部を含有する新規F a s 抗原変異体、好ましくは欠失したアミノ酸残基数が29以上であり、特に好ましくは欠失したアミノ酸残基数が29であるF a s 抗原の1または2以上の部分からなる新規F a s 抗原変異体である新規F a s 抗原誘導体が含まれる。

具体的には本発明のF a s 抗原変異体には、そのC末端側に図1、2の第

10 158～174残基のポリペプチド、第175～319残基のポリペプチド、または第158～319残基のポリペプチドを含有するものが含まれ、第158～319残基のポリペプチドから得られる任意の長さの任意の断片を任意の順番に組み合わせたものをF a s 抗原変異体のC末端またはN末端、好ましくはC末端側に含有するものも含まれる。

15 ここで、欠失したアミノ酸残基数が29である好ましい新規F a s 抗原変異体は配列表の配列番号9 (s h F a s (n d 2 9)) のアミノ酸配列を含有するものであり、より好ましくは該アミノ酸配列からなるものである。

新規F a s 抗原誘導体には他の化学物質等、例えば(ポリ)ペプチド、糖鎖、脂質またはその他の高分子もしくは低分子の化合物等との結合物が包含され、こ

20 のうち他の(ポリ)ペプチドとの融合ポリペプチドが好ましい。該(ポリ)ペプチドは、全く限定されず、また、2種以上の(ポリ)ペプチドを含んでもよく、その場合当該2種以上の(ポリ)ペプチドの結合順番を入れ換えることもでき、

アミノ酸以外のものを含んでも構わない。

他の化学物質等と必須の新規 F a s 抗原変異体の結合の種類は特に限定されず、共有結合および非共有結合の何れもが含まれるが、結合の安定性から共有結合によるものが好ましい。特に他の化学物質が（ポリ）ペプチドの場合、ペプ

5 チド結合が好ましい。

また、結合の部位も適宜選択可能であり、当該新規 F a s 抗原変異体の N 末端、C 末端および側鎖の何れも結合部位として用いることができるが、好ましくは両末端のいずれかもしくは両方、より好ましくは C 末端を介して結合する。

- 10 他の化学物質が（ポリ）ペプチドである場合、該（ポリ）ペプチドは、当該新規 F a s 抗原誘導体の活性または機能を向上または修飾するような作用を有する（ポリ）ペプチド等が好ましい。例えば、安定性もしくは血中半減期を向上させるもの、または特定の組織、細胞もしくはその他の特定部位への集積性を高めるものが含まれ、血中半減期を延長させる例としては F c 断片が挙げられる。当該
- 15 新規 F a s 抗原誘導体が多量体になるような機能を有する（ポリ）ペプチド等が特に好ましい。多量体化するような（ポリ）ペプチドとしてはイムノグロブリン重鎖および軽鎖の定常領域の全体もしくは部分、重鎖定常領域の第 1 領域（C H 1）を除く領域の全体もしくは部分、または F c 断片（I g G の場合、ヒンジ領域、C H 2 領域および C H 3 領域からなるものとする）の全体もしくは部
- 20 分（例えばヒンジ領域、C H 2 領域、C H 3 領域もしくは C H 4 領域の各領域の単独または任意の組合せ）等があげられ、F c 断片およびヒンジ領域の少なくとも 1 部からなるものが好ましいが、ヒンジ領域のシステイン残基の少なくとも 1

つ、好ましくは全部を含むヒンジ領域の部分、または該ヒンジ領域の部分もしくはCH3領域(IgMおよびIgEの場合、CH4領域)を含むFc断片およびヒンジ領域の部分がより好ましく、ヒンジ領域全体を含むFc断片の全体もしくは部分およびヒンジ領域そのものが特に好ましい。

- 5 この場合のイムノグロブリンは、由来する種は何れでもよいが、ヒト由来のものが好ましい。また、クラス及びサブクラスに関しても必ずしも限定されず、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgEおよびIgD等の何れもが使用可能であるが、例えば、IgGが好ましい例である。Fc断片等を含む新規Fas抗原誘導体は、通常2量体を形成し得る
- 10 が、由来するクラスがIgMの場合、10量体に、またIgAの場合、4量体を形成するものも含まれる。

ところで、イムノグロブリンの定常領域、特にFc領域は、その抗体の抗原特異性とは直接関与しない抗体分子の種々のエフェクター機能等に重要であることが知られている。例えば、補体の結合および活性化、Fc受容体(FcR)との

15 結合、ADCC活性の誘導、胎盤通過性、マスト細胞の顆粒放出反応等ならびにプロテインA反応性がある。

これらの機能は、本発明の新規Fas抗原誘導体に取り込まれた場合、有効に利用しうるものであるが、ある場合、例えば特定の疾患においては、医薬として生体に投与した場合には副作用を惹起する原因となる可能性も有している。そこ

20 で、そのような場合には、それらのエフェクター機能等の全部または一部を除去したFc断片等が好ましく、例えばIgGのCH2領域の糖付加部位に変異を導入して該部位の糖鎖を欠失させたFc変異体、CH2領域を欠失したIgGの定

常領域もしくはF c断片、またはヒンジ領域等が好ましい例である。

また、新規F a s抗原誘導体における、新規F a s抗原変異体と他の（ポリ）ペプチド等との結合は、直接的であることが好ましいが、間接的なものでもよく、例えば新規F a s抗原誘導体の活性や機能を大きく損なわないようなペプ

5 チドリンカーまたは適当な化学的スペーサーを介して結合してもよい。

本発明の新規F a s抗原誘導体は、多量体化することによりその活性または機能がさらに改良される。

多量体は、2量体以上のものを全て含むが、好ましくは2～10、より好ましくは2または3、特に好ましくは2量体である。またホモおよびヘテロポリマー

10 のいずれも含まれるが、ホモポリマーがより好ましい。

多量体化の方法は、それ自体多量体化しうる様な（ポリ）ペプチドの多量体化する性質を利用することが好ましい方法である。前記の、イムノグロブリンの定常領域またはその部分（例えばF c断片およびヒンジ領域）の多量体化する性質を利用することが特に好ましい方法であるが、その他にヒンジ様構造をとりうる

15 システイン含有ペプチドまたは該ペプチドを含有するポリペプチドを使用してもよい。また、それ以外にF a s抗原またはTNF-Rの細胞内領域等も使用することができる。多量体における各単量体間の結合は、いかなる結合でもよく、共有結合（例えばジスルフィド結合やペプチド結合）が好ましいが、非共有結合（例えばイムノグロブリンの2つのCH3領域間、またはF a s抗原もしくは

20 TNF-Rの細胞間領域間の結合）でもよい。

その他に、化学的架橋による方法がある。例えば、

1) C末端にシステインを導入後、2種類の活性化リンカーを用いて架橋

する。システインの導入には、システインアミドおよびカルボキシペプチダーゼ
Yを用いる方法がある。C末端アミノ酸がリジンである場合には、リジンエンド
ペプチダーゼを適用する。また、遊離システインが存在する場合は、C末端にシ
ステインを導入する前に予めアルキル化によって保護しておく。その後、活性化
5 リンカーを用いて架橋する。例えば、2 価の架橋試薬としては、N, N' - o -
フェニレンジマレインイミド (Glennie 等、J. Immunol. 139
巻、2367 - 2375 頁、1987 年) 等が、また、3 価の架橋試薬とし
ては、トリスーマレインイミド化合物 (特開平 6 - 228091) 等が抗体の架
橋に使用されており、本発明の新規 Fas 抗原誘導体にも応用可能であり、それ
10 ぞれ 2 量体または 3 量体を形成することができる。

2) C末端にビオチンを導入後、アビジン等を用いて架橋する。ビオチンアミ
ドを用いてシステインと同様にC末端に導入する。アビジン架橋により 4 量体が
形成されるが、反応条件によっては高度な凝集体が形成する。また、他の機能性
ポリペプチド等を結合することもできる。ビオチン-アビジン間の結合は、強力
15 な非共有結合の例である。

3) 新規 Fas 抗原誘導体配列内またはこれと結合させた (ポリ) ペプチド等
に存在するシステイン、チオールまたはアミノ基に特異的な架橋試薬を用いて架
橋する。

以上の場合において、適当な長さのペプチド性もしくは化学的リンカーまたは
20 スペーサーが使用できる。

また、新規 Fas 抗原誘導体が、例えば脂質または疎水性ペプチド等の脂溶性
物質を包含することにより公知の方法に従ってリボソーム化することも可能であ

る。例えば、F a s 抗原の細胞膜貫通領域を含有する本発明の新規F a s 抗原誘導体は、それ自体リボソーム等に取り込ませることが可能である。これらのリボソームは、高度な多量体であるとともに、さらに適当に修飾することにより特定の細胞や組織に取り込ませる等の応用も可能である。

- 5 本発明の新規F a s 抗原誘導体のうち多量化能を有するものの好適な具体例は、配列表の配列番号10 (s h F a s (n d 2 9) - h i n g e) および11 (s h F a s (n d 2 9) - F c) のアミノ酸配列を含有するものが挙げられ、より好ましくは該配列からなるものである。

- 配列番号10、11のポリペプチドの多量体のうち2量体は、ヒトF a s 抗原
- 10 細胞外領域のN末端から29個のアミノ酸残基を欠失させることにより活性が向上した本発明のF a s 抗原誘導体を2量体化したもので2量体化しても向上した活性を損なうことなく結果として2量体化することにより非常に高いF a s リガンド結合活性およびアポトーシス抑制活性を有する。

- 一般に、ポリペプチドは、種の相違あるいは個体の相違によって、そのポリペ
- 15 プチドが本来有する機能を基本的に有したまま、進化の過程において生じた変異によりアミノ酸配列が異なっている。ここでいうアミノ酸配列の変異とは、
- 1) ポリペプチドのアミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸残基の欠失、2) 他のアミノ酸残基への置換、3) 上記のアミノ酸配列中の任意の位置に1つ以上のアミノ酸残基の挿入あるいは付加をいう。このような変異は、遺伝子工学的な技術
- 20 を用いて人工的に生じさせることも可能であり、このような変異を有するポリペプチドも本願の新規F a s 抗原誘導体に含まれる。

また新規F a s 抗原誘導体はN末端にメチオニン残基またはシグナルペプチド

由来もしくはプロペプチド由来の1以上のアミノ酸残基が付加されているものでもよい。

本発明の第1の態様の新規F a s 抗原誘導体は、その特徴を失わない限り、いかなる修飾を受けていてもよい。修飾としては、天然の蛋白質が通常受けるであろう、ポリペプチドの翻訳過程または翻訳後の修飾および化学的修飾等がある。天然の修飾としては、例えば糖鎖の付加等があげられ、蛋白質に対する糖付加としては、N-グリコシレーション、O-グリコシレーションおよび非酵素的な糖付加などが知られており、本発明第1の態様の新規F a s 抗原誘導体は、何れの糖鎖を有していても有していなくてもよい。

10 本発明の新規F a s 抗原誘導体は、N-グリコシレーションサイトを有する場合があります。例えば、29個のN末端領域アミノ酸残基欠失F a s 抗原細胞外領域は、2個のN-グリコシレーションサイトを有している。したがって、当該新規F a s 抗原誘導体は、これを産生する宿主によって糖鎖を有する場合があります。すなわち、動物細胞および酵母などの真核細胞を宿主とすると産生された上記タンパク質は上記N-グリコシレーションサイトに糖鎖を有し、大腸菌などの原核細胞を宿主とすると糖鎖を有しないと考えられる。また、糖鎖の数、長さ、または糖鎖の糖組成および配列はこれら宿主の培養時の培地組成などによっても異なるため、特に限定されない。その他の天然の修飾としては、脂質の結合等がある。

20 近年の技術開発により、ポリペプチドをさらに様々に修飾することが可能となった。修飾可能な部位としては、N末端もしくはC末端のアミノ酸残基または側鎖の官能基が含まれる。例えば、ポリエチレングリコール、スチレン-マレ

イン酸コポリマー、デキストラン、ピランコポリマー、ポリリジン等の合成高分子、脂質、多糖類や（ポリ）ペプチドなどの天然分子、ホルモン等の生理活性分子、マグネタイト等の無機物質等をポリペプチドに結合させることができるようになった（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84巻, 1487
5 -1491頁（1981年）；Biochemistry, 28巻, 6619-
6624頁（1989年））。

その他の修飾を受けた誘導体には、例えば、カルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアまたは一級若しくは二級アミンとの反応によるカルボキシル基のアミド、アシル残基（例えばアルカノイルまたはカルボキシルアロイル基）に
10 よって形成されるアミノ酸残基の遊離アミノ基のN-アシル誘導体、あるいはアシル残基によって形成された遊離ヒドロキシル基（例えばセリンまたはスレオニン残基のヒドロキシル基）のO-アシル誘導体が包含される。

本発明の新規F a s 抗原誘導体も上述のような公知の方法の組み合わせによって上述のような修飾が可能である。従って、本発明の新規F a s 抗原誘導体
15 には、本発明第1の態様のポリペプチドの特徴を失わない限り、このような修飾を受けたものも含まれる。また、それらの修飾によって、本発明の第1の態様の新規F a s 抗原誘導体の活性または機能を修飾または向上させたり、別の活性または機能を付与したり、組み合わせることも可能である。例えば、活性または機能としては、安定性、溶解性、体内動態または特定の細胞、組織もしくは臓器へ
20 の指向性等が含まれる。そのような修飾を受けた新規F a s 抗原誘導体も本発明の範囲に含まれる。

また、本発明の新規F a s 抗原誘導体は、塩の形で存在するものも包含する。

ここで、「塩」とは、蛋白質分子のカルボキシル基の塩およびアミノ基への酸付加塩の両者を意味するものである。カルボキシル基の塩は本技術分野でよく知られている方法によって形成され、無機塩、たとえばナトリウム、カルシウム、アンモニウム、三価の鉄または亜鉛の塩等、および有機塩たとえばトリエタノールアミン、アルギニンもしくはリジン、ピペリジン、プロカイン等によって形成される塩を包含する。酸付加塩には、たとえば塩酸もしくは硫酸のような鉱酸との塩、および有機酸たとえば酢酸もしくはシュウ酸との塩が包含される。

本発明の新規 F a s 抗原誘導体は医薬への応用が可能であるが、その場合には上記の修飾等は医薬的許容性を維持するものであることが望ましい。

10 また、上記第一の態様の新規 F a s 抗原誘導体の生産方法は特に限定されず、天然物から分離精製されたものでもよく、一般的に使用される化学合成機（ペプチドシンセサイザー 430A 型、パーキン・エルマー・ジャパン）などを用いて人工合成してもよく、遺伝子組換え法により得たものであってもよい。またそれ等から分離精製されたポリペプチドを適切な化学的処理、例えば酵素を用いて処理
15 することによって、欠失または断片化させて得られるもの、およびそれらを化学的に結合させたものおよび多量体化させたものでもよい。すなわち、本発明の新規 F a s 抗原誘導体のうち単量体は、多量体を製造するための中間体または中間材料としても有用である。

上記のうち、生産量、生産されたタンパク質の均一性または純度の面、例
20 えば、ヒト由来の他の夾雑タンパク質を含まないこと等から本発明第 5 の態様で詳述する遺伝子工学的に生産されたものであることが好ましい。

遺伝子工学的に生産する 1 例を以下に簡単に説明する。実施例 1（1）で述べ

るプラスミド pM1097 は、配列表の配列番号 9 のアミノ酸配列をコードする配列番号 12 の塩基配列で表される DNA および Fas 抗原のシグナルペプチドをコードする DNA を含有する。これを適当なベクター、例えば実施例で示される pEF-BOS に dhfr 遺伝子を組み換えたプラスミド pM1103 へ組み
5 換えることによって作製した発現ベクターを用いて COS-1 細胞を形質転換し、得られた形質転換体の培養上清から、shFas (nd29) を得た。

本発明の新規 Fas 抗原誘導体の活性または機能のうちアポトーシス抑制活性は、Fas 抗原発現細胞のアポトーシスに対する抑制率を測定することによって調べることができる。例えば、標的である Fas 抗原発現細胞としては、
10 Fas 抗原を発現する培養細胞株または形質転換細胞を、エフェクターとしては、Fas リガンドを発現するように形質転換して得られた細胞または Fas リガンド細胞外領域などの可溶性 Fas リガンドを用いて、⁵¹Cr リリースアッセイまたは MTT アッセイ (Mosmann T.、J. Immunol. Methods、65 巻、55-63 頁、1983 年) 等により求める。具体的
15 な方法は、実施例に示してある。当該新規 Fas 抗原誘導体は、マウス細胞 WR19L をヒト Fas 抗原を発現するように形質転換させて得られた WC8 細胞に対するアポトーシス抑制活性が、対応する N 末端領域非欠失 Fas 抗原 (誘導体) と比較して活性において少なくとも大であること、例えば 1.4 倍以上、好ましくは 2 倍以上、より好ましくは 3 倍以上、さらに好ましくは 5 倍以上、特
20 に好ましくは 10 倍以上である。

本発明の新規 Fas 抗原誘導体は、Fas 抗原を介するアポトーシスを調節し得るので、生体内で生じる Fas 抗原を介するアポトーシスの亢進または不全の

関与する疾患の予防、および治療に有用である。例えば、好ましい本発明の新規 F a s 抗原誘導体は、F a s リガンドと F a s 抗原との結合を拮抗的に阻害して アポトーシスの誘導を阻害し得るので、肝炎等の重篤な感染症の際に肝細胞等の アポトーシスを妨げ、主要臓器・組織における細胞の急激な減少を防ぐこと

5 によってこれらの組織および臓器の機能の低下を防止することが可能であり、ウイルス等による感染症およびその合併症の治療に使用することができ、例えば、インフルエンザ、エイズ、肝炎等の治療薬として使用することができる。また、ある種の自己免疫疾患、例えば糖尿病、再灌流障害等の虚血性心疾患における心筋障害、腎炎、多臓器不全ならびに臓器移植の際の臓器保全および移植片対宿主

10 病（GVHD）等の処置にも有用である。

本発明の新規 F a s 抗原誘導体は、F a s リガンドとより特異的でかつ高い親和力で結合するので、F a s リガンドの検出にも使用可能である。また、F a s 抗原が保有する抗原性の少なくとも一部を保持しているので、抗 F a s 抗体とも結合する事が可能であり、抗 F a s 抗体によるアポトーシスの抑制にも効果的で

15 ある。

また、F a s リガンド自体を、治療や研究に使用するためには、当該蛋白質を高純度で、大量に生産することが必要になるが、本発明の新規 F a s 抗原誘導体は、アフィニティークロマトグラフィー用カラムの作製に使用することができ、F a s リガンド等の F a s 抗原に結合する物質の精製にも有用である。

20 本発明の第 2 の態様は、本発明の第一の態様の新規 F a s 抗原誘導体をコードする DNA である。

本明細書の DNA 及び組換え DNA 分子の説明において「塩基配列を含有する

DNA」とは、あるDNAがその塩基配列からなるDNAであってもよく、また、その塩基配列の5'末端あるいは3'末端のいずれか一方、もしくはその両方に1つ以上の任意の塩基が付加された配列からなるものであってもよいことを意味する。

- 5 本発明の新規DNAは、本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体、好ましくは、配列表の配列番号9～11のアミノ酸配列をコードする塩基配列の少なくとも一部を含有するものである。一般に、アミノ酸をコードするDNAのトリプレット（コドン）は、アミノ酸の種類によって1種類から6種類まで存在することが知られているので、本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体のアミノ酸
- 10 配列をコードするDNAの塩基配列は1種類には限定されない。従って、本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体、好ましくは、配列表の配列番号9～11のアミノ酸配列の少なくとも一部、より好ましくは全部をコードする塩基配列を含有するDNAである限り、いかなる塩基配列からなるものであっても、本発明の範囲内に含まれる。本発明の新規DNAは、さらに好ましくは、配列表の配列
- 15 番号9～11に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列のうち配列表の配列番号12～14の少なくとも一部を含有するDNAであり、特に好ましくは、配列表の配列番号12～14の塩基配列の全体を含有するものである。

本発明のDNAはcDNA、染色体DNAおよびそれらの組合せならびに適当にスプライシングされうるイントロンを含むcDNAであってもよい。しかし、

- 20 遺伝子工学的な取扱いの容易さから、本発明のDNAはcDNAであることが好ましい。

本発明によれば、本発明の新規DNAに対応するRNA、または本発明の新規

DNAと相補的な配列を含有するDNA及びRNAも提供される。本発明の新規DNAとそれに相補的なDNA及びRNAとが、互いに相補的に結合して2本鎖、あるいは3本鎖を形成していても良い。また本発明の新規DNAと雑種形成（ハイブリダイズ）しうる塩基配列を含有するDNA及びRNAも提供される。この場合においてもそれらが互いに結合して2本鎖、あるいは3本鎖を形成していても良い。以上の場合、核酸塩基として、イノシンのようなユニバーサルベースを有していてもよい。

本発明の第2の態様のDNAは、いかなる方法で得られたものであってもよい。例えば、化学合成されたものであってもよく、適当なDNAライブラリーから得たものであっても、ヒトFas抗原の全長または部分をコードするDNAを含むDNAを鋳型としてPCR（Polymerase Chain Reaction）法で得たものであってもよい。また、これらの方法で得たDNAまたはその断片を必要に応じてアニーリング、ライゲーションして作製することもできる。

15 本発明のDNAは、以下のようにして化学合成をすることができる。具体的には、本発明のDNAを約20－30塩基からなる断片に分けて、DNA化学合成機（例えば、394型、アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、複数の断片として合成し、その後、必要に応じて各断片の5'末端をリン酸化して各断片をアニーリングし、ライゲーションして目的のDNAを得る。

20 また本発明のDNAは、ゲノムライブラリーもしくはcDNAライブラリー等を鋳型とするPCR法によっても得ることができる。PCR法を用いる場合、公知の塩基配列および本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体をコードするD

NA等の塩基配列をもとに、また必要に応じて制限酵素認識配列等組み合わせて設計した、センスプライマー及びアンチセンスプライマーを作製し、任意のDNAライブラリー等に対して公知の方法（ミカエル A. I (Michael A. I.) 等編、Polymerase Chain Reaction,

5 PCR Protocols, a guide to methods and applications (1990年)、アカデミック出版 (Academic Press)、参照) に準拠して行うことによって得ることができる。典型的な例は、実施例において述べる。

上述したDNAライブラリーは、本発明の第二の態様のDNAまたはその一部
10 を含むものであればよく、特に限定されない。したがって、市販のDNAライブラリーを使用してもよく、ヒトの末梢血などから得たリンパ球、ヒトの株化細胞、またはハイブリドーマなどといった適当な細胞を、必要があれば適当な活性化剤で活性化し、サンプブック J. らの方法に準拠してcDNAを作製して使用してもよい。なお、ヒトFas抗原をコードするDNAを含む形質転換
15 体は、本発明の出願人により日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（以下、生命工学工業技術研究所という）に受託番号FERM BP-3826として寄託されている。

本発明の第2の態様の新規DNAは、本発明の第3の態様の組換えDNA分子の作製に使用することができ、この組換えDNA分子によって宿主を形質転換さ
20 せることにより、本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体を均一にかつ大量に生産するために使用することができる。

これによって、新規Fas抗原誘導体を治療薬の主成分として医薬の分野に提

供したり、診断薬として利用することが可能になる。本発明の新規DNAを用いて本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体を産生する方法は、本発明第5の態様で説明する。

さらに、本発明の第2の態様のDNAは、遺伝的にまたは後天的にFasリガ
5 ンドまたはFas抗原を介したアポトーシスに異常を有する患者の遺伝子治療に
応用することができる。すなわち、本発明の新規DNAを適当なベクターに連結
し、生体または細胞に直接導入して、関節リュウマチおよびSLE等の自己免疫
疾患、エイズ、肝炎ならびに腎炎等の患者の治療および発症予防を行うこともで
きる。

10 次に、本発明の第3の態様の組換えDNA分子について説明する。本発明の第
3の態様の組換えDNA分子は、上述した本発明の第2の態様の新規DNAを含
むことを特徴とする。

本発明の新規組換えDNA分子は、環状または直鎖状等、1本鎖または2本鎖
ならびにその複合した鎖等、いかなる形態のものであってもよく、目的に応じて
15 適宜選択しうるが、取り扱いの容易さや宿主中への組み込みの容易さからは、環
状であることが好ましく、安定性等からは2本鎖であることが好ましい。

本発明の新規組換えDNA分子は、本発明の第2の態様のDNAの塩基配列の
5'末端、あるいは3'末端のいずれか一方、もしくはその両方に任意の1つ以
上の塩基が付加されたものであってもよい。

20 ここで付加される塩基は、本発明の新規DNAに、コーディングフレームのず
れを生じさせない限りいかなるものであってもよく、例えば、アダプター配列、
リンカー配列、シグナル配列をコードする塩基配列、 β -ガラクトシダーゼ等の

他のポリペプチドをコードする塩基配列、もしくはDNAプローブ等を作製する際にその検出感度の増加を目的として付加される配列等を挙げることができる。

- 本発明の組換えDNA分子は、本発明の第2の態様の新規DNAに加えて、必要により他の塩基配列を含有していることが好ましい。ここでいう「他の塩基配列」とは、エンハンサーの配列、プロモーターの配列、リボゾーム結合部位配列、DNAのコピー数の増幅を目的として使用される塩基配列、翻訳開始コドン、シグナルペプチドをコードする塩基配列、他のポリペプチドをコードする塩基配列、翻訳終止コドン、ポリA付加配列、スプライス配列、複製開始点、選択
- 10 マーカーとなる遺伝子配列等をいう。

- どのような塩基配列が必要となるかは、作製する組換えDNA分子の使用目的によって定まるが、好ましくは本発明の第一の態様の新規F a s 抗原誘導体を産生するように宿主細胞を形質転換できるものであり、したがって、当該組換えDNA分子は少なくとも、本発明第二の態様の新規DNAに加えて翻訳開始コ
- 15 ドン、終止コドン、複製開始点および選択マーカー遺伝子の配列を含有していることが好ましく、さらに宿主内で機能するプロモーター配列を含有しているものがより好ましい。特に、これらの配列に加えて、シグナルペプチドをコードする配列を含有するものは、本発明の第一の態様の新規F a s 抗原誘導体を分泌発現するように、宿主細胞を形質転換できるので好ましい。例えば、配列表の配列番
- 20 号12～14の塩基配列の全体を含有するDNAを適当なベクター中でシグナルペプチドをコードするシグナル配列の下流に接続した組換えDNA分子を作製し、これを用いて適当な宿主を形質転換させると、ここで得られた形質転換体

の培養時にはその培養上清中に配列表の配列番号 9 ～ 11 に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを分泌させることができる。接続するシグナル配列は、適宜選択することが可能であるが、F a s 抗原、特にヒト F a s 抗原のシグナルペプチドをコードするシグナル配列が好ましく、図 1 または図 3 に示したヒト F a s 抗原のシグナルペプチドをコードするシグナル配列等がその例である。

その他に、T N F または G - C S F のシグナルペプチド、大腸菌のアルカリフォスファターゼのシグナルペプチド、酵母の P H O 1 のシグナルペプチドおよび酵母の α -ファクター (α -f a c t o r) のシグナルペプチドをコードする配列等から使用する宿主および条件に応じて適したものを選択して利用することができる。

選択マーカー遺伝子としては、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子等を挙げることができる。少なくとも 2 つの選択マーカーが含まれている新規組換え DNA 分子が、酵母や哺乳動物細胞を宿主にする場合に、目的遺伝子で形質転換されたクローンを容易に選択できるという理由から好ましい。コピー数の増幅を目的として使用される配列としては、デヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 (d h f r) の配列等を使用することができる。

宿主内で機能するプロモーター配列としては、宿主が大腸菌の場合は t r p プロモーターまたは l a c プロモーターであり、宿主が酵母や C O S 細胞などの真核細胞の場合はアルコールオキシダーゼ 1 (A O X 1) のプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、S V 4 0 プロモーター、S R α のプロモーター、またはヒ

トエロンゲージンファクター 1α (EF 1α) のプロモーターなどの配列を挙げることができる。

本発明の組換えDNA分子の好ましい例は、宿主の観点からすると、本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体を発現するように大腸菌を形質転換させ得るものである。従って、本発明の組換えDNA分子は、少なくとも、大腸菌の複製開始点、マーカー配列に加えて大腸菌内部で機能するプロモーター配列を有していることが好ましく、さらにシグナルペプチドをコードする配列を有していることが好ましい。

大腸菌で機能する好適なプロモーター配列としては、trpプロモーター、lacプロモーター等であり、大腸菌で機能するシグナルペプチドとしては、大腸菌のアルカリフォスファターゼのシグナルペプチドが好適である。

また、より好ましい例は、本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体を発現するように動物細胞または酵母等の真核細胞を形質転換させるものである。

この場合には、本発明の組換えDNA分子は、少なくとも、翻訳開始コドン、終止コドン、選択マーカー遺伝子に加えてポリA付加配列を、さらに動物細胞で機能するSV40のプロモーター、ヒト伸長因子(Elongation Factor 1α (EF 1α)) のプロモーター、SR α プロモーターまたは、酵母で機能するアルコールオキシダーゼ1(AOX1) のプロモーターならびに、SV40の複製開始点等を有するものが本発明の組換えDNA分子の好適な例として挙げられる。

本発明の第3の態様の組換えDNA分子は、本発明の第2の態様の新規DNAを任意の塩基配列を有する他のDNA断片とライゲーションする方法、または任

意のベクターに導入する方法（サムブルック J. (Sambrook J.)
等：Molecular Cloning, a Laboratory
Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor
Laboratory, ニューヨーク (New York), 1989年,

5 参照) 等で得ることができる。

具体的には、DNAとベクターとをそれぞれ適当な制限酵素で消化して、得ら
れた各断片をDNAリガーゼを用いてライゲーションさせればよい。ベクターと
しては、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター等いかなる
ものでもよく、市販品を利用してもよい。ベクターの代表的なものとしては、

10 pUC118、pBR322、pSV2-dhfr、pBluescript
II、PHIL-S1、λZapII、λgt10、pAc700、YRP
17、pEF-BOS、pEFN-II等が挙げられるが、pEF-BOS等
を用いることが高発現を期待できることから好ましい。

また、本発明の第3の態様の組換えDNA分子は、いかなる用途に使用される
15 ものであってもよい。例えば、本発明の第1の態様の新規Fas抗原誘導体を工
業的に産生させる際に用いるものであってもよいし、本発明第2の態様の新規D
NAを増幅させ量産するために用いるものであってもよい。また、本発明の第3
の態様の組換えDNA分子は、本発明の第4の態様の形質転換体を作製するため
に使用できる。

20 次に、本発明の第4の態様の形質転換体について説明する。本発明の形質転換
体は、本発明の第3の態様の組換えDNA分子で形質転換されたことを特徴とす
る。すなわち、本発明の形質転換体は、本発明の第3の態様の組換えDNA分子

を、宿主となる細胞や微生物に導入する事によって得ることができる。

本発明の形質転換体は、原核細胞、真核細胞のいずれを形質転換したものであってもよい。原核細胞としては、大腸菌、枯草菌などを挙げることができる。真核細胞としてはC O S細胞、C H O細胞、H e L a細胞、
5 N a m a l w a細胞等の哺乳動物細胞の他、S f細胞等の昆虫細胞や酵母を挙げることができる。このうち、大腸菌、哺乳動物細胞、酵母を形質転換して得られた形質転換体は扱いやすく、高発現量が期待できるので好ましい。

哺乳動物細胞の中では、遺伝子のコピー数を増加させることができるため、C H O細胞のd h f r欠損株を宿主とすることが好ましい。また、酵母の中では、
10 外来タンパク質の分泌生産量が多いために、ピキア（P i c h i a）属の酵母を宿主とすることが好ましい。

また、本発明の組換えDNA分子の機能を十分に発揮させるためには、本発明の組換えDNA分子の作製に使用するベクターは、宿主細胞に適した種類のものでなければならない。組換えDNA分子に使用したベクターと宿主との好ましい
15 組合わせの例としては、p U C 1 1 8と大腸菌、p E F B O SとC O S細胞あるいはC H O細胞、Y a cと酵母、A c N P VとS f細胞等（実験医学臨時増刊、遺伝子工学ハンドブック、1991年3月20日発行、羊土社、参照）を挙げることができる。同様に、組換えDNA分子に含まれるプロモーター、シグナルペプチドをコードする塩基配列、マーカー遺伝子等も宿主に適したものを使
20 用する。

また、本発明第1の態様の新規F a s抗原誘導体を発現する形質転換体を得るためには、当該組み換えDNA分子中には、適当なプロモーター等発現に必要な

配列を有している必要がある。

本発明の第1の態様の新規F a s 抗原誘導体を分泌生産する形質転換体を得るには、本発明の第3の態様の上記生産に適した組み換えDNA分子であって、本発明の第二の態様のDNAの上流にシグナルペプチドをコードする塩基配列を含

5 有する組み換えDNA分子で、宿主細胞を形質転換させればよい。

宿主細胞に、本発明第三の態様の組み換えDNA分子を導入する方法としては、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、アルカリ金属法、リン酸カルシウム法、DEAEーデキストラン法、マイクロインジェクション法、ウイルス粒子を用いてインフェクションさせる方法、その他の公知方法（実験医学臨

10 時増刊、遺伝子工学ハンドブック、1991年3月20日発行、羊土社、参照）等から、宿主または組換えDNA分子に適したものを選択すればよい。リン酸カルシウム法やDEAEーデキストラン法を使用すると、哺乳動物細胞の形質転換が効率よく行われるので、宿主細胞が哺乳動物細胞である場合には、これらの方法を使用することが好ましい。

15 本発明の形質転換体は、好ましくは、本発明の第一の態様の新規F a s 抗原誘導体を発現する形質転換体がよく、とくに好ましくは、該ポリペプチドを発現し、培養上清中に分泌するものがよい。このような形質転換体を使用すれば、本発明の新規F a s 抗原誘導体を大量に生産することが容易になるからである。

20 本発明の第4の態様の形質転換体は、いかなる目的で使用するものであってもよいが、本発明の第2の態様のDNAまたは第3の態様の組換えDNA分子を大量に製造する目的や、本発明の第1の態様の新規F a s 抗原誘導体を工業的に製

造する目的等に使用できる。

本発明の第 5 の態様の製造方法は、本発明の第 4 の態様の形質転換体を使用することを特徴とする本発明の第 1 の態様の新規 F a s 抗原誘導体の製造方法である。形質転換体の作製方法については上述した通りである。本発明の製造方法に
5 においては、本発明の第 4 の態様の形質転換体を培養し、必要に応じて遺伝子の増幅や発現誘導を行う。次いで培養混合物を回収し、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種のクロマトグラフィー等の操作を適宜組み合わせて、本発明の新規 F a s 抗原誘導体の精製を行う。

本発明の第 5 の態様において、「培養混合物」とは、形質転換体、形質転換体
10 を含む培地、もしくは培養上清または細胞のライセートを意味する。産生された前記の新規 F a s 抗原誘導体が細胞培養上清中に分泌される場合は、培養上清から該ポリペプチドを精製できる。一方、新規 F a s 抗原誘導体が形質転換体内に蓄積される場合には、リゾチーム処理、界面活性剤処理、凍結融解、加圧、超音波処理その他の方法から宿主細胞に適したものを適宜選択して細胞を溶解または
15 破碎した後、遠心分離、濾過等の方法により可溶性画分または不溶性画分として該ポリペプチドを回収し、精製する。

宿主細胞が大腸菌であって、前記新規ポリペプチドがペリプラズムに蓄積される場合には、ウィルスキー (W i l l s k y) 等の方法 (J . B a c t e r i o l . , 1 2 7 巻, 5 9 5 - 6 0 9 頁, 1 9 7 6 年) を採用して
20 該ポリペプチドを回収することができる。

形質転換体の培養は、各種の成書を参考にして、一般的な手法で行うことができる (例えば、「微生物実験法」社団法人日本生化学会編、株式会社東京化学同

遺伝子の発現誘導を行う場合には、組み込まれたプロモーターによって適当な薬剤を選択して使用する。例えば、trpプロモーターが組み込まれている場合には3-β-インドールアクリル酸を用い、MMTVプロモーターの場合にはデキサメタゾンを、またAOX1プロモーターの場合にはメタノールをそれぞれ使用するとよい。

遺伝子の増幅方法の代表的な例としては、d h f r 欠損 C H O 細胞を宿主とし、d h f r を有するベクターを使用した際にメトトレキセートを用いる方法等が挙げられる。

- 以下に、形質転換体として大腸菌、CHO細胞等の哺乳動物細胞、ピキア

- t r pプロモーターを有する組換えDNA分子で形質転換された大腸菌では、Lーブローズ (LーB r o t h) で菌体を前培養し、それをM9ーCAの培地に対して1／50量となるように植え込み、37℃で培養を行う。培養開始数時間後に培地のOD550値が1～4 (すなわち対数増殖期) に達した時点で3βー

- 20 インドールアクリル酸を終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し発現誘導を行う。さらに約 1～2 日の培養を行うことにより、目的蛋白質を含む培養混合物を得ることができる。

A O X 1 プロモーターを有する組換え DNA 分子で形質転換されたピキア (P i c h i a) 属の酵母を用いる場合には、B M G Y 培地で約 2 日間前培養し、培地交換後、メタノールを加えて発現誘導する。さらに、3 0 °C で約 1 ~ 2 日間の培養を行い、目的蛋白質を含む培養混合物を得ることができる。

- 5 エロンゲーションファクターのプロモーターを有する組み換え DNA 分子で C H O 細胞等の哺乳動物細胞を形質転換して得られた形質転換体は、1 0 % ウシ胎児血清を含有する D M E M 培地で培養する。細胞は、約 $1 \sim 10 \times 10^4$ 細胞 / m l の濃度で植え込み、3 7 °C、5 % 炭酸ガス / 9 5 % 空気の条件で培養を行う。通常、2 ~ 3 日後にコンフルエントな状態になるので、その時点で培
- 10 地を、血清不含の D - M E M に交換する。さらに引き続き、2 ~ 3 日間の培養を行うことにより目的蛋白質を含む培養混合物を得ることができる。なお、目的蛋白質の産生量が少ない場合には前述したようにメトトレキセートにより遺伝子を増幅し、産生量を増加させることも可能である。

- 上述の培養混合物から本発明の第 1 の態様の新規 F a s 抗原誘導体を精製する
- 15 方法としては、通常ポリペプチドの精製に使用されている方法のなかから適当な方法を適宜選択して行う。具体的には、塩析法、限外濾過法、等電点沈澱法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーや抗体クロマトグラフィー等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィーおよび逆相クロマ
- 20 トグラフィー等、通常使用される方法の中から適切な方法を適宜選択し組み合わせ、必要により H P L C システム等を用いて精製を行えば良い。特に、抗 F a s 抗体のうち本発明の新規 F a s 抗原誘導体を認識する抗体、F a s リガンドまた

はプロテインA等をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーは、当該新規ポリペプチドの精製においても有用である。

当該製造方法において、本発明第一の態様の新規F a s 抗原誘導体は、大腸菌の β -ガラクトシダーゼや、他のポリペプチドとの融合蛋白質として発現させてもよいが、この場合には、精製工程のいずれかのステップにおいて、融合蛋白質をブロムシアンまたはヒドロキシルアミン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理して当該蛋白質を切り出す操作が必要になる。

また、使用する形質転換体が大腸菌であった場合に、当該蛋白質を不溶化蛋白質であるインクルージョンボディーとして産生させた場合には、精製の際に、インクルージョンボディーを可溶化し、デネイチャーし、リフォールディングするという操作を精製の適当なステップで行えばよい(トマス E. 及びクライトン J. (Thomas E. and Creighton J.), J. Molecular Biology, 87巻, 563-577頁, 1974年)。

15 具体的には、まず、菌体を破碎し、遠心分離してペレットを回収する。次に、尿素もしくはグアニジン塩酸、界面活性剤、還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンを適量含む可溶化バッファー(たとえば、5 M グアニジン塩酸、0.005 % Tween 80、50 mM トリス塩酸(pH 8.0)、5 mM EDTA、2 mM 還元型グルタチオン、0.02 mM 酸化型グルタチオンを含む緩衝液)をペレットに加え、2-メルカプトエタノールを加えてデネイチャーし、上記可溶化バッファーからグアニジン塩酸を取り除いた溶液に対して透析してリフォールディングする。融合蛋白質として発現させている場合には、これら

の操作の後で、ブロムシアン等の化学物質もしくはプロテアーゼ等の酵素で不要な蛋白質部分を切断し、その後、適当なクロマトグラフィーを行う。

当該製造方法によれば、医薬品などに有用な Fas 抗原活性を有する本発明の新規 Fas 抗原誘導体を均一にかつ高効率で工業的に大量生産することができる。

次に、本発明の第 6 の態様の医薬について説明する。本発明の第 6 の態様の医薬は、第 1 の態様の新規 Fas 抗原誘導体またはその生理的に許容されうる塩を有効成分として含有する。

また、必要に応じて医薬的に許容されうる担体、賦形剤、安定剤、滑沢剤、着色剤、崩壊剤、防腐剤、等張化剤、安定化剤、分散剤、酸化防止剤、干渉剤、保存剤、懸濁化剤、乳化剤、一般的に用いられる適当な溶媒の類（滅菌水や植物油等）、さらには生理的に許容しえる溶解補助剤などを適宜添加した医薬組成物とすることができる。

本発明の医薬には種々の投与経路が可能であるが、非経口投与が好ましい。非経口投与としては例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、筋肉内投与等の注射が一般的であり、その他に直腸内投与、経皮吸収、経粘膜吸収等が挙げられる。この場合、剤形としては、坐剤、吸入剤、特に注射剤などが好適である。

本発明の第 6 の態様の医薬は、Fas 抗原を介するアポトーシスの異常、特に病的状態における内因性の Fas リガンドの過剰生産または外因性の Fas リガンドの過量投与による過剰なアポトーシスを来したヒトまたは動物に投与することにより、過剰なアポトーシスを制御し、アポトーシスの異常に起因する種々の病態ならびに疾患を予防および治療することができる。有効成分である新規 Fas

s 抗原誘導体またはその生理的に許容されうる塩の有効な含有量、または投与量および処方 は病態に応じて適宜決定される。

本発明の第 7 の態様は、F a s 抗原の N 末端アミノ酸残基から最も N 末端よりのシステイン残基までのアミノ酸残基（該システイン残基は除く）のうち少なくとも 5 とも 1 つを欠失させることを特徴とする、F a s 抗原または F a s 抗原誘導体の活性または機能を改良する方法である。また、F a s 抗原の N 末端から数えて 1 ～ 4 2 番目のアミノ酸残基のうち少なくとも 1 つを欠失させることを特徴とする、活性または機能を改良された F a s 抗原または F a s 抗原誘導体の設計方法および作製方法を提供する。該作製方法は、本発明の第 1 の態様の新規 F a s 10 抗原誘導体を製造し、活性等を測定することにより改良を確認する工程を含む。N 末端領域から欠失させるアミノ酸残基の選択方法、該欠失を有するポリペプチドの製造方法および活性の測定方法等については前述したとおりである。

実施例

以下に、実施例をもって本発明を一層具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。また、15 以下の記載において用いる略号は、当該分野における慣用略号に基づくものである。なお、以下に示す実施例中の諸操作は、主に下記の雑誌、成書を参考として実施した。

1. ミカエル A. I. (Michael A. I.) 等編、Polymer
20 ase Chain Reaction, PCR Protocols, a
guide to methods and applications

(1990年)、アカデミック出版 (Academic Press)

2. サムブルック J. (Sambrook J.) 等: Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク (New York), 1989年

5 3. 実験医学臨時増刊、遺伝子工学ハンドブック1991年3月20日発行、羊土社

4. 「微生物実験法」社団法人日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行、1992年

5. 免疫実験操作法、日本免疫学会編、日本免疫学会発行

10 6. 今本文男等編〔組換え遺伝子の細胞への導入と発現〕蛋白質核酸酵素臨時増刊28(14)1983年

7. 岡田善雄監修〔細胞工学的技術総集編〕実験医学臨時増刊7(13)1989年

(実施例1) 新規ポリペプチドの発現ベクターの作製

15 (1) プラスミドpM1097の作製

センスプライマー1 (CTGACTAGTGTCGCTACTCAGAACT
TGGAA) およびアンチセンスプライマー2 (GTCAAGCTTGGTAC
CCTATTAGTTAGATCTGGATCCTTC) を化学合成した (配列
表の配列番号1および2)。このセンスプライマー1はSpeIサイト (ACT
20 AGT) とヒトFas抗原シグナルペプチドをコードする塩基配列の3'末端領
域およびヒトFas抗原の30番目から34番目のアミノ酸をコードする塩基配
列を含んでいる。一方、アンチセンスプライマー2はヒトFas抗原の細胞外領

域のC末端側をコードする塩基配列とHindIII サイト (AAGCTT)、KpnI サイト (GGTACC) を含んでいる。

得られたセンスプライマー1、アンチセンスプライマー2をそれぞれ100 pmol、ヒトFas抗原をコードするDNA (イトウ N.、(Itoh N.) 等、Cell、66巻、233-243頁、1991年) を含むプラスミドpBLF58-1を0.5 μg、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20 nmol、2.5ユニットのPfuDNAポリメラーゼと添付のPfuバッファー (共にストラタジーン社製) を10 μl含む100 μlの溶液を調製した。DNAサーマルサイクラー (PCRシステム9600、パーキンエルマー社製) を使用して、94℃、30秒; 55℃、30秒; 72℃、1分を1サイクルとするPCRを30サイクル行った。得られたPCR産物をSpeI、HindIII で二重消化し、約410 bpのDNA断片を国際特許出願公開WO 95/13293の実施例21に記載したヒトFas抗原シグナルペプチドとヒトFasリガンド細胞外領域をコードするDNAを含むプラスミドpM1081のSpeI、HindIII サイトに組み込み、得られたプラスミドをpM1097と命名した。本プラスミドは配列表の配列番号12の塩基配列で表されるDNAを含有するプラスミドである。

(2) プラスミドpM1303の作製

まず、センスプライマー3 (TCACAAGCCCAGCAACACCAAG)、アンチセンスプライマー4 (GCTTGCCGGCCGTCGCACTC)、センスプライマー5 (GAAGGATCCAGATCTAACGAGCCCAAATCTTGT) およびアンチセンスプライマー6 (GTCGGTACC

CTATCATTTACCCGGAGACAG)を化学合成した(配列表の配列番号3、4、5および6)。このセンスプライマー3はヒトイムノグロブリンG1のCH1領域のC末端側をコードする塩基配列を、アンチセンスプライマー4はヒトイムノグロブリンG1の3'非翻訳領域の配列を含む。またセンスプライマー5はヒトFas抗原細胞外領域のC末端側に位置するアミノ酸をコードする塩基配列とヒトイムノグロブリンG1のヒンジ領域のN末端側に位置するアミノ酸配列をコードする塩基配列およびBamHIサイト(GGATCC)を含んでいる。アンチセンスプライマー6はヒトイムノグロブリンG1のCH3領域のC末端側に位置するアミノ酸配列をコードする塩基配列とKpnIサイト(GGTACC)を含んでいる。得られたセンスプライマー3およびアンチセンスプライマー4をそれぞれ100 pmol、Human Spleen 5'-Stretch cDNA Library (クローンテック社製)を1 μ l、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20 nmol、2.5ユニットのPfuDNAポリメラーゼと添付のPfuバッファーを10 μ l含む100 μ lの溶液を調製し、(1)と同条件でPCR反応を行った。さらに、得られた約750 bpのPCR産物を鋳型とし、センスプライマー5およびアンチセンスプライマー6をそれぞれ100 pmol、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20 nmol、2.5ユニットのPfuDNAポリメラーゼと添付のPfuバッファーを10 μ l含む100 μ lの溶液を調製し、(1)と同様にPCR反応を行った。得られたPCR産物をBamHI、KpnIで二重消化し、約720 bpのDNA断片を(1)で作製したpM1097のBamHI、KpnIサイト間に組み込み、得られたプラスミド

を pM1303 と命名した。本プラスミドは、配列表の配列番号 14 の塩基配列で表される DNA を含有するプラスミドである。

(3) pM1304 の作製

(2) で作製した pM1303 を EcoRI、KpnI で二重消化し、約 1150 bp の DNA 断片を pEF-BOS (ミズシマ S. (Mizushima S.) およびナガタ S. (Nagata S.)、Nucleic Acids Res. , 18 巻、5322 頁、1990 年) に dhfr 遺伝子を組換え修飾したプラスミド pM1103 の EcoRI、KpnI サイト間に組み込み、得られたプラスミドを pM1304 と命名した。本プラスミドは、配列表 10 の配列番号 11 のアミノ酸配列からなるポリペプチド (shFas (nd29) -Fc と本明細書中で表記することがある) の発現ベクターである。

(4) pM1317 の作製

まず、センスプライマー 7 (TGCGAATTCACCATGCTGGGCA TCTGG)、アンチセンスプライマー 8 (CGGGGTACCTCACTAT 15 GGGCACGGTGGGCA) を化学合成した (配列表の配列番号 7 および 8)。このセンスプライマー 7 は EcoRI サイト (GGATCC) と ヒト Fas 抗原シグナルペプチドをコードする配列の 5' 末端領域を含んでいる。アンチセンスプライマー 8 はヒトイムノグロブリン G1 のヒンジ領域の C 末端側に位置するアミノ酸をコードする塩基配列と KpnI サイト (GGTACC) を含 20 んでいる。得られたセンスプライマー 7 およびアンチセンスプライマー 8 をそれぞれ 100 pmol、(3) で作製した pM1304 を 0.3 μ g、dATP、dCTP、dGTP、dTTP をそれぞれ 20 nmol、2.5 ユニットの

Pfu DNAポリメラーゼと添付のPfuバッファーを10 μ l含む100 μ lの溶液を調製し、(1)と同様にPCR反応を行った。得られたPCR産物をEcoRIとKpnIで二重消化し、約450bpのDNA断片を(3)で使
5 用したpM1103のEcoRI、KpnIサイトに組み込み、得られたプラスミドをpM1317と命名した。本プラスミドは、配列表の配列番号10のアミノ酸配列からなるポリペプチド(shFas(nd29)-hingeと本明細書中で表記することがある)の発現ベクターである。なお、本発明者らは、公知方法にてプラスミドpM1304およびpM1317で、大腸菌JM109を形質転換させ、得られた形質転換体大腸菌JM109(pM1304)およびJM109(pM1317)を、日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号工業技術院生命工学工業技術研究所へ、1996年3月14日付で寄託し、1997年3月6日にブタペスト条約に基づき移管した(受託番号FERM BP-5854、FERM BP-5855)。

(実施例2) 形質転換体の作製および培養

15 pM1304、pM1317、および国際特許出願公開WO95/13293の実施例1に記載のpBF-Fc1(ヒトFas抗原の細胞外領域とヒトIgG1のFc領域とのキメラ蛋白質(hFas-Fcと表記することがある)の発現プラスミド)を使用して、以下の方法で形質転換体COS-1/pM1304、COS-1/pM1317、COS-1/pBF-Fc1を作製した。すな
20 わち、それぞれのプラスミドDNA100 μ gを500 μ lの10mMTris-HCl(pH7.4)/1mMエチレンジアミン四酢酸(以下、TEバッファーと略す)溶液に溶解した。これらに、それぞれ0.2mg/mlDEAE

ーデキストランおよび50mM Tris-HCl (pH7.4)を含有するD-
MEM (日水製薬) 125mlを添加し、DNA-DEAEデキストラン混合
液を作製した。1700cm² ローラーボトル (コーニング社製) でセミコンフ
ルエントまで単層培養したCOS-1細胞にDNA-DEAEデキストラン混合
5 液を添加し、37℃にて培養し、形質転換体COS-1/pM1304、COS
-1/pM1317、COS-1/pBF-Fc1を得た。4時間後、DNA-
DEAEデキストラン混合液を除去し、10%ウシ胎児血清 (ライフテックオリ
エンタル社製) を含有するD-MEM培地に交換し、さらに24時間培養した。
その後、培地をphenol red free D-MEM (FBS, BSA
10 無添加) に交換し、さらに72時間培養した後、培養上清を回収した。

(実施例3) shFas (nd29)-Fcの精製

(1) アフィニティークロマトグラフィー

COS-1/pM1304培養上清1lに、硫酸 (硫酸アンモニウム; 和光純
薬工業社製) を70%飽和になるように添加し、溶解した後、一晚4℃で静置し
15 た。生じた沈殿を8,000rpm、4℃で30分間遠心分離をして回収し
た後、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) に懸濁し、PBSに対して透析した。得
られた懸濁液57mlに、2倍量のアフィブレッププロテインA結合バッファー
(バイオラッド社製) を加えて希釈した。濾過によって不溶物を除いた後に、使
用説明書通りに平衡化したアフィブレッププロテインAプレパラティヴカー
20 トリッジ (バイオラッド社製; 7.3ml) カラムにアプライした。カラムをア
フィブレッププロテインA結合バッファー90mlで洗浄後、アフィブレップ
プロテインA溶出バッファー (バイオラッド社製) でshFas (nd29)

ーFcを溶出した。ヒトFas抗原に対するモノクローナル抗体を用いたELISAによって求めたshFas(nd29)-Fcを含む画分をブールし、フィルトロンオメガセル(フジフィルター社製;分画分子量30kD)を用いて限外濾過を行い、濃縮した。この濃縮液を0.9%NaClに対して透析し、

5 精製shFas(nd29)-Fcを得た。また、同様にして、hFas-Fcを精製した。各標品のタンパク質量はウシ血清アルブミンを標準物質としてLowry法で測定した。

(2) SDS-PAGE

(1)で得た精製shFas(nd29)-Fcを用いて0.1%SDSを含む5-20%グラジエントゲルを用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、2D-銀染色試薬・II「第一」(第一化学薬品社製)で染色し、バンドを検出した。shFas(nd29)-Fc精製の結果を図6に示す。図中、レーン1~4は非還元下、レーン5~8は還元下の結果である。図6に示すように、

10 精製されたshFas(nd29)-Fcは非還元下(レーン1~3)で2量体に相当する分子量約85kD、還元下(レーン5~7)で単量体に相当する

15 約43kDのほぼ1本のバンドとして検出された。

(実施例4) shFas(nd29)-FcのN末端アミノ酸配列分析

(1) 逆相HPLCによる被験サンプルの脱塩

実施例3で得られた精製shFas(nd29)-Fcを、以下の要領で逆相HPLCに供した。まず、前記精製shFas(nd29)-Fcを、予め0.05%トリフルオロ酢酸にて平衡化したVYDAC C4カラム(4.6mmφ×25cm、サイプレス社製)に供し、次いでカラムを0.05%トリフ

20

ルオロ酢酸で洗浄した。洗浄後、0.05%トリフルオロ酢酸/0~100%アセトニトリルを使用し、直線濃度勾配法により流速1ml/分にて溶出を行った。

(2) N末端アミノ酸配列分析

- 5 溶出されたメインピークの画分を凍結乾燥し、70%蟻酸に溶解してサンプルとし、モデル477Aプロテインシーケンシングシステム-120APTHアナライザー（パーキンエルマー社製）を使用し、そのN末端アミノ酸配列を決定した。即ち、PTHアミノ酸の検出を270nmの紫外吸収にて行い、予め同一の方法で分離した標準PTHアミノ酸（パーキンエルマー社製）の保持時間を
- 10 基準にしてアミノ酸を同定した。この結果、ヒトFas抗原のN末端アミノ酸29残基を欠失したN末端アミノ酸配列（ThrGlnAsnLeuGluGlyLeuHisHisAsp）を有していることが確認された。

（実施例5）shFas（nd29）-Fc及びhFas-Fcのアポトーシス抑制活性の比較

- 15 shFas（nd29）-Fc及びhFas-Fcが1A12細胞及びFLm14細胞のWC8細胞及びW4細胞に対する細胞障害活性を抑制する活性を指標として測定した。1A12細胞はヒトFasリガンドを発現するようにマウスWR19L細胞を形質転換させた細胞であり、また、FLm14細胞はマウスFasリガンドを発現するようにマウスFDC-P1細胞を形質転換させた細胞
- 20 である。WC8細胞はヒトFas抗原を、W4細胞はマウスFas抗原を発現させるようにマウスWR19L細胞を形質転換させた細胞である。このWR19L細胞は、マウスFas抗原を殆ど発現せず、TNFの細胞障害作用に感受性の細

胞である。細胞障害活性の測定は、ルービエ E. (Rouvier E.) 等の方法に準じて行った (J. Exp. Med., 177 巻、195-200 頁、1993 年)。まず、1A12 細胞或は FLm14 細胞を 10% 非働化 FBS 含有 RPMI 1640 で洗浄し、エフェクター細胞とした。一方、100 μ l の 10% 非働化 FBS 含有 RPMI 1640 中で、20 μ Ci の [51 Cr] クロム酸ナトリウム (NEN 社製) と共に 1×10^6 個の WC8 細胞または W4 細胞を 37°C で 2 時間インキュベートした。10% 非働化 FBS 含有 RPMI 1640 で洗浄した後、これらの細胞をターゲット細胞として使用した。
1 $\times 10^4$ 個の 1A12 細胞或は 1×10^5 個の FLm14 細胞とターゲット細胞 1×10^4 個とを、様々な濃度の shFas (nd29)-Fc 及び hFas-Fc と丸底のマイクロタイタープレートの各ウェル中で混合した。このとき全液量が計 100 μ l になるようにした。800 rpm で 2 分間、プレートの遠心操作を行った後、37°C で 4 時間インキュベートした。更に、1,200 rpm で 5 分間プレートの遠心操作を行い、各ウェルより上清 50 μ l を分取して γ カウンターを用いて放射活性を測定し、特異的細胞溶解率を算出した。 51 Cr の自然放出は、培地のみでターゲット細胞をインキュベートすることにより決定し、一方、最大放出量は、ターゲット細胞に 0.1% となるように Triton X-100 を加えることにより決定した。また、特異的細胞溶解率は次の式により算出した。

特異的細胞溶解率 (%)

$$= \frac{\text{実測の } ^{51}\text{Cr の放出量} - ^{51}\text{Cr の自然放出量}}{^{51}\text{Cr の最大放出量} - ^{51}\text{Cr の自然放出量}} \times 100$$

5 1A12細胞をエフェクター細胞とし、WC8細胞をターゲット細胞としたときのshFas (nd29) -Fc及びhFas -Fcの特異的細胞障害抑制活性を図9に、FLm14細胞をエフェクター細胞とし、W4細胞をターゲット細胞としたときのshFas (nd29) -Fc及びhFas -Fcの特異的細胞障害抑制活性を図10に示した。図9および図10に示したように、shFas
10 (nd29) -FcはhFas -Fcと比較して3～10倍高い細胞障害抑制活性を有していた。

(実施例6) shFas (nd29) -hingeの精製

(1) 抗Fas抗原モノクローナル抗体固定化アフィニティークラムの調製

ヒトFas抗原で免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞を用いて公
15 知の方法 (KohlerとMilstein, Nature, 256巻、495
頁、1975年) で作製した、抗Fas抗原モノクローナル抗体 (4B4 -
B3) 350mgを、120mlのホルミルセルロファイン (生化学工業
社製) と混合し、4℃で2時間攪拌した。次いで、650mgのトリメチルアミ
ンボラン (和光純薬工業社製) を添加し、一晩攪拌して抗体を結合させた。固定
20 化されなかった抗体を除くため、樹脂を2.4lの超純水で洗浄した。更
に、0.2M Tris-HCl (pH8.0) 中で650mgのトリメチルア
ミンボランとともに4℃で3時間攪拌させ、未反応のホルミル基をブロックし、
抗体アフィニティークラムを得た。

(2) アフィニティークロマトグラフィー

COS-1/pM1317培養上清10lを、フィルترونミニセット(分画分子量10kD; フジフィルター社製)で限外濾過濃縮し、1.5lとした。その後、濃縮液に1M Tris-HCl (pH9.0)を添加してpH8.0
5 に調製し、1M NaClを含む50mM Tris-HCl (pH8.0)にて予め平衡化した抗Fas抗原モノクローナル抗体固定化アフィニティークラムにアプライした。カラムを1M NaClを含む50mM Tris-HCl (pH8.0)320mlで洗浄後、1M NaClを含む0.1M glycine-HCl (pH2.5)でshFas(nd29)-
10 hingeを溶出した。ELISAによって求められたshFas(nd29)-hingeを含む画分をプールし、フィルترونオメガセル(分画分子量10kD; フジフィルター社製)を用いて限外濾過を行い、濃縮した。この濃縮液を0.9%NaClに対して透析し、精製shFas(nd29)-hingeを得た。

15 (3) SDS-PAGE

(2)で得た精製shFas(nd29)-hingeを用いて0.1% SDSを含む5-20%グラジエントゲルを用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、2D-銀染色試薬・II「第一」(第一化学薬品社製)で染色し、バンドを検出した。shFas(nd29)-hinge精製の結果を図7に
20 示す。図中、レーン1は非還元下、レーン2は還元下の結果である。図7に示すように、精製されたshFas(nd29)-hingeは非還元下で分子量約43kD及び約27kDの2本のバンドとして、還元下で約23kD及び

27 kDの2本のバンドとして検出された。

(4) ゲル濾過クロマトグラフィー

実施例6(2)で得られたshFas(nd29)-hingeを、50 mM Tris-HCl/0.5 M NaCl(pH8.0)で予め平衡化したSephadex75カラム(ファルマシア社製)に添加し、50 mM Tris-HCl/0.5 M NaCl(pH8.0)で溶出することによりゲル濾過を行い、214 nmの吸光度を指標にして分画した。実施例6(2)と同様にして、各画分を濃縮した後ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。図8に示したように、高分子量側の画分(フラクション1および2)に含まれ、おそらく2量体に相当すると考えられるバンドと、低分子量側の画分(フラクション3および4)に含まれ、単量体に相当すると考えられるバンドに分離することができた。両画分は共に、実施例8で述べるようなアッセイにおいて細胞障害抑制活性を示したが、高分子量側の画分がより強い活性(約50倍以上)を示した。

15 (実施例7) shFas(nd29)-hingeのN末端アミノ酸配列分析

実施例6(2)で得た精製shFas(nd29)-hingeを用い、モデル477Aプロテインシーケンシングシステム-120APTHアナライザー(パーキンエルマー社製)を使用し、そのN末端アミノ酸配列を決定した。即ち、PTHアミノ酸の検出を270 nmの紫外吸収にて行い、予め同一の方法で分離した標準PTHアミノ酸(パーキンエルマー社製)の保持時間を基準にしてアミノ酸を同定した。この結果、ヒトFas抗原のN末端アミノ酸29残基を欠失したN末端アミノ酸配列を有していることが確認された。

(実施例 8) s h F a s (n d 2 9) - h i n g e 及び h F a s - F c のア
ポトーシス抑制活性の比較

s h F a s (n d 2 9) - h i n g e 及び h F a s - F c が、1 A 1 2 細胞及
び F L m 1 4 細胞の W C 8 細胞及び W 4 細胞に対する細胞障害活性を抑制する活
5 性を実施例 5 と同様にして測定した。1 A 1 2 細胞をエフェクター細胞と
し、W C 8 をターゲット細胞としたときの s h F a s (n d 2 9) - h i n g e
及び h F a s - F c の特異的細胞障害抑制活性を図 1 1 に、F L m 1 4 細胞をエ
フェクター細胞とし、W 4 細胞をターゲット細胞としたときの s h F a s
(n d 2 9) - h i n g e 及び h F a s - F c の特異的細胞障害抑制活性を
10 図 1 2 に示した。図 1 1 および図 1 2 に示したように、s h F a s (n d 2 9)
- h i n g e は h F a s - F c と比較して 3 ~ 1 0 倍高い細胞障害抑制活性を有
していた。

(実施例 9) F a s 抗原細胞外領域の N 末端領域付近における構造の解析

F a s 抗原細胞外領域の立体構造モデルを構築し、N 末端領域におけるアミノ
15 酸残基の欠失と F a s 抗原 - F a s リガンド間の結合との関係を解析した。F a
s 抗原細胞外領域のアミノ酸配列と相同性が高い立体構造既知の蛋白質を、生体
高分子立体構造のデータベースである P R O T E I N D A T A B A N K
(P D B) から、B I O S Y M 社製、H o m o l o g y モジュール中の F A S T
A プログラムによって検索した。その結果、T N F レセプター p 5 5 の細胞外領
20 域 (P D B - I D 1 T N R) が全体構造的に相同性が高いことが判明した。こ
の構造は、T N F - β との複合体を形成しており、F a s 抗原 - F a s リガンド
複合体モデル構造を構築する上でも参照蛋白質として最適であった。また、

F a s リガンド構造においては、TNF- α (PDB-ID 1TNF) 構造も参照蛋白質とした。モデル構造の構築は、B I O S Y M 社製、H o m o l o g y モジュールを用いてホモロジーモデリング法によっておこなった。構築したモデル初期構造を、B I O S Y M 社製分子力場計算ソフトウェアのD I S C O V E R

5 を用いてエネルギー最適化計算 (MM計算) をかけ、F a s 抗原、F a s リガンド複合体モデル構造を得た。次に、得られた構造のN末端領域の一部が、参照蛋白質の座標から発生させることができなかったため、この部分の構造予測を行った。複合体構造からF a s 抗原細胞外領域単量体モデル構造を抽出し、N末端に欠失している31アミノ酸残基をB I O S Y M 社製B I O P O L Y M E R

10 モジュールで自動的に付加し、構造を極小化した。次に、真空中で1000 K、100ピコ秒の分子動力学計算 (MD計算) を行い10ピコ秒毎の構造をサンプリングした。サンプリングした構造は、各々極小化し最終的なF a s 抗原細胞外領域単量体モデル構造とした。これらの構造をF a s リガンドモデル構造と再度複合体をつくらせたところ、F a s 抗原細胞外領域のN末端構造がF a s リガ

15 ンドとの結合において立体障害となりえることが、予測された。一方、n d 2 9 モデル構造をMD計算によるシミュレーション解析したところ、F a s リガンドとの結合に障害となるような構造の大部分は欠失しており、より迅速にF a s リガンドと結合することが予測された。さらに、サンプリングした構造の複数のコンフォメーションとF a s リガンド構造との複合体モデルにおける立体障害の状態

20 について解析した。その結果、F a s 抗原のN末端から数えて1番目のアルギニン残基から31番目のグルタミン残基までの範囲においては、アミノ酸残基を欠失させる程立体障害が除かれ、特に13または18以上のアミノ酸残基を欠失し

た Fas 抗原の細胞外領域のアポトーシス抑制活性が上昇することが予測された。また、N末端から数えて36番目のロイシン残基から42番目のフェニルアラニン残基までの範囲の欠失では活性の上昇は期待しにくく、Fas 抗原のN末端から数えて43番目のシステイン残基を欠失させると抗原が形成している25 次構造の破壊のためにアポトーシス抑制活性が失われる可能性のあることが予測された。今回の立体構造モデルの解析により、Fas 抗原細胞外領域のN末端構造を削ることによってFas リガンドとの結合力を調整しうることが示された。

(実施例10) shFas (nd29) -Fcのマウス肝障害抑制作用

- 10 C57BL/6Cr Slcマウス(雄、9週齢、日本エスエルシー株式会社製)を用い、1群5匹、3群を被験動物として用いた。同マウスに1.5mg/mlの濃度になるように生理食塩水(大塚製薬株式会社製)に溶解したプロピオンバクテリウムアクネス加熱死菌(リビウムノケミカルコーポレーション社製)液を尾静脈から0.2ml投与した。8日後に、実施例3で調製したshFas
- 15 (nd29) -Fcを希釈液(0.1%ヒト血清アルブミン((財)化学及血清療法研究所)含有生理食塩水)で希釈し、0.3mg/8ml/kg、1mg/8ml/kgの用量で尾静脈から投与した。対照群には希釈液を投与した。5分後に5マイクログラム/mlの濃度になるように生理食塩水で調製したリポポリサッカライド(シグマ社製)液を0.2ml腹腔内に投与した。リポポリサッカ
- 20 ライド投与8、24時間後に眼底から75マイクロリットルを採血した。採血した血液は3.8%クエン酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社製)水溶液8.3マイクロリットルと混合後、3000回転、10分間遠心した。遠心後、得られ

た血漿を液体窒素で凍結後、使用時までマイナス30度で保存した。GOT、GPTの測定はGOT-FAテストワコー（和光純薬工業株式会社製）、GPT-FAテストワコー（和光純薬工業株式会社製）とオートアナライザー（ロッシュ社製、コバスファラ）を用いて測定した。その結果、shFas（nd29）-Fc 1mg/8ml/kg投与群においてGOTおよびGPTの値は対照群のそれよりも低値であり、肝障害抑制効果が認められた（図13）。

（実施例11）shFas（nd29）-hingeの Maus肝障害抑制作用
C57BL/6CrSlcマウス（雄、9週齢、日本エスエルシー株式会社製）を用い、1群5匹、4群を被験動物として用いた。同マウスに1.5mg/mlの濃度になるように生理食塩水（大塚製薬株式会社製）に溶解したプロピオンバクテリウムアクネス加熱死菌（リビウムケミカルコーポレーション社製）液を尾静脈から0.2ml投与した。8日後に、実施例6で調製したshFas（nd29）-hingeを希釈液（0.1%ヒト血清アルブミン（（財）化学及血清療法研究所）含有生理食塩水）で希釈し、0.3mg/8ml/kg、15mg/8ml/kg、3mg/8ml/kgの用量で尾静脈から投与した。対照群には希釈液を投与した。5分後に5マイクログラム/mlの濃度になるように生理食塩水で調製したリポポリサッカライド（シグマ社製）液を0.2ml腹腔内に投与した。リポポリサッカライド投与8、24時間後に眼底から75マイクロリットルを採血した。採血した血液は3.8%クエン酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社製）水溶液8.3マイクロリットルと混合後、3000回転、10分間遠心した。遠心後、得られた血漿を液体窒素で凍結後、使用時までマイナス30度で保存した。GOT、GPTの測定はGOT-FAテストワコー（和光純

薬工業株式会社製)、GPT-F Aテストワコー(和光純薬工業株式会社製)とオートアナライザー(ロッシュ社製、コバスファラ)を用いて測定した。その結果、shFas(nd29)-hinge投与群のGOTおよびGPTの値は対照群のそれよりも低値であり、肝障害抑制効果が認められた(図14)。

5 産業上の利用の可能性

- 本発明の新規ポリペプチド(新規Fas抗原誘導体)は、FasリガンドとFas抗原との結合を拮抗的に阻害してアポトーシスの誘導を阻害し得るので、Fas抗原を介するアポトーシス、特に内因性または外因性のFasリガンドにより生体内で生じるアポトーシスを調節し、Fas抗原を介したアポトーシスの関与が示唆されている種々の疾患の予防および治療に使用する事ができる。例えば、ある種の自己免疫疾患においては、人為的に新規Fas抗原誘導体を用いてアポトーシスを抑制することにより、自己抗原反応性のT細胞攻撃による急激な細胞死を抑制し、臓器の破壊を防ぐことが可能になるであろう。具体例としては、移植片対宿主病(GVHD)あるいは糖尿病があげられる。また、
- 15 ウイルス感染時には免疫反応により細胞が除去されるが、この際には感染細胞ばかりでなく非感染細胞も同時に除去されてしまうことが知られている。たとえば、エイズウイルス感染後期の免疫能の低下や、肝炎特に劇症肝炎における肝機能低下は、免疫担当細胞あるいは肝細胞のアポトーシスにより組織の機能が著しく低下した結果と考えられる。このような状態においては、アポトーシスを抑
- 20 制する新規Fas抗原誘導体をインフルエンザ、エイズ、肝炎等のアポトーシスが関与するウイルス感染症およびその合併症の治療に使用することができる。そ

その他、F a s 抗原はその広い臓器分布から種々の臓器における細胞の死に関与していると考えられることから、心筋梗塞等の虚血性心疾患における心筋障害、例えば再灌流障害、腎炎、多臓器不全および臓器移植の際の臓器保全にも有効であると考えられる。特に、本発明の新規F a s 抗原誘導体は、低用量で強力にアポ
5 トーシスを抑制することから、生体内においても低用量で有効でかつ副作用を低率に押えうることが期待されるので、有効性および安全性ならびにコストの面からも有用性が高い。特にヒト由来配列からなる本発明の新規F a s 抗原誘導体は、ヒトへの適用上好ましいものである。

また、適切に細胞に取り込まれた場合アポトーシスを誘導しうる形態の新
10 規F a s 抗原誘導体は、リポソーム化等により適切に細胞に取り込ませることにより、または、本発明の第2の態様のDNA等を用いて遺伝子治療的方法で適切に細胞上で発現させることによりアポトーシスを促進する。従って、不要な細胞、例えばウイルス感染初期のウイルス感染細胞の除去等に有効であり、また、アポトーシスの不全が原因と考えられる疾患、例えば関節リウマチおよび
15 S L E等の予防および治療においても使用可能である。

また、F a s 抗原が保有する抗原性の少なくとも一部を保持しているので、抗F a s 抗体とも結合する事が可能であり、抗F a s 抗体によるアポトーシスの抑制にも効果的である。

また、本発明の新規F a s 抗原誘導体は、特異的にかつ高い親和力でF a s リ
20 ガンドと結合するので、ヒト体液中のF a s リガンドの検出にも応用しうる。F a s リガンドの関与が示唆されている種々の疾患におけるF a s リガンドの増加減少または異常を検出するために使用できるため、特定の疾患及び病態の

予知、検出および診断または治療方法の選択のために応用しうる。またF a s リガンド及びF a s リガンド関連物質ならびにF a s リガンドの発現に影響を与える薬剤による治療を受けている患者のモニタリング及び治療効果および予後の判定にも有用である。

- 5 一方、本発明の第2の態様のDNA等は、高純度の新規F a s 抗原誘導体を工業的に大量生産するために有用である。これによって、新規F a s 抗原誘導体を治療薬の主成分として医薬の分野に提供したり、診断薬として利用することが可能になる。また、新規F a s 抗原誘導体をコードする塩基配列は遺伝子治療等にも応用することもできる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

- 5 配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー1)

配列 :

CTGACTAGTG TCGCTACTCA GAACTTGAA 30

配列番号 : 2

配列の長さ : 39

- 10 配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー2)

配列 :

GTCAAGCTTG GTACCCTATT AGTTAGATCT GGATCCTTC 39

配列番号 : 3

- 15 配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー3)

配列 :

TCACAAGCCC AGCAACACCA AG 22

配列番号 : 4

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー4)

5 配列 :

GCTTGCCGGC CGTCGCACTC 20

配列番号 : 5

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

10 配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー5)

配列 :

GAAGGATCCA GATCTAACGA GCCCAAATCT TGT 33

13 配列番号 : 6

配列の長さ : 30

15 配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー6)

配列 :

GTCGGTACCC TATCATTTAC CCGGAGACAG 30

配列番号 : 7

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (センスプライマー7)

5 配列 :

TGCGAATTCA CCATGCTGGG CATCTGG 27

配列番号 : 8

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

10 配列の種類 : 他の核酸 合成DNA (アンチセンスプライマー8)

配列 :

CGGGGTACCT CACTATGGGC ACGGTGGGCA 30

配列番号 : 9

配列の長さ : 128

15 配列の型 : アミノ酸

配列 :

Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys

1

5

10

15

Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly

20

25

30

35

Asp Glu Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp
 35 40 45
 Lys Ala His Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu
 50 55 60
 5 Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu
 85 90 95
 His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys
 10 100 105 110
 Thr Leu Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn
 115 120 125

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 1 4 3

15 配列の型 : アミノ酸

配列 :

Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys
 1 5 10 15
 Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly
 20 25 30

Asp Glu Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp
 35 40 45
 Lys Ala His Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu
 50 55 60
 5 Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu
 85 90 95
 His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys
 10 100 105 110
 Thr Leu Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn
 115 120 125
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 130 135 140

15 配列番号 : 1 1

配列の長さ : 3 6 0

配列の型 : アミノ酸

配列 :

Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys
 20 1 5 10 15

Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly
 20 25 30
 Asp Glu Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp
 35 40 45
 5 Lys Ala His Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu
 50 55 60
 Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr
 65 70 75 80
 Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu
 10 85 90 95
 His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys
 100 105 110
 Thr Leu Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn
 115 120 125
 15 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 130 135 140
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 165 170 175
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 195 200 205
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 210 215 220
 5 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 245 250 255
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 10 260 265 270
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 275 280 285
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 290 295 300
 15 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 325 330 335
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 20 340 345 350
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 3 8 4

配列の型 : 核酸

配列の種類 : c D N A t o m R N A

5 配列 :

```
ACTCAGAACT TGGAAGGCCT GCATCATGAT GGCCAATTCT GCCATAAGCC CTGTCCTCCA 60
GGTGAAAGGA AAGCTAGGGA CTGCACAGTC AATGGGGATG AACCAGACTG CGTGCCCTGC 120
CAAGAAGGGA AGGAGTACAC AGACAAAGCC CATTTTCTT CCAAATGCAG AAGATGTAGA 180
TTGTGTGATG AAGGACATGG CTTAGAAGTG GAAATAAACT GCACCCGGAC CCAGAATACC 240
10 AAGTGCAGAT GTAAACCAA CTTTTTTTGT AACTCTACTG TATGTGAACA CTGTGACCCT 300
TGCACCAAAT GTGAACATGG AATCATCAAG GAATGCACAC TCACCAGCAA CACCAAGTGC 360
AAAGAGGAAG GATCCAGATC TAAC 384
```

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 4 2 9

15 配列の型 : 核酸

配列の種類 : c D N A t o m R N A

配列 :

```
ACTCAGAACT TGGAAGGCCT GCATCATGAT GGCCAATTCT GCCATAAGCC CTGTCCTCCA 60
GGTGAAAGGA AAGCTAGGGA CTGCACAGTC AATGGGGATG AACCAGACTG CGTGCCCTGC 120
20 CAAGAAGGGA AGGAGTACAC AGACAAAGCC CATTTTCTT CCAAATGCAG AAGATGTAGA 180
```

TTGTGTGATG AAGGACATGG CTTAGAAGTG GAAATAAACT GCACCCGGAC CCAGAATACC 240
AAGTGCAGAT GTAAACCAAA CTTTTTTTGT AACTCTACTG TATGTGAACA CTGTGACCCT 300
TGCACCAAAT GTGAACATGG AATCATCAAG GAATGCACAC TCACCAGCAA CACCAAGTGC 360
AAAGAGGAAG GATCCAGATC TAACGAGCCC AAATCTTGTG ACAAACCTCA CACATGCCCC 420
5 CCGTGCCCA 429

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 1 0 8 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : c D N A t o m R N A

10 配列 :

ACTCAGAACT TGGAAGGCCT GCATCATGAT GGCCAATTCT GCCATAAGCC CTGTCCTCCA 60
GGTGAAGGA AAGCTAGGGA CTGCACAGTC AATGGGGATG AACCAGACTG CGTGCCCTGC 120
CAAGAAGGGA AGGAGTACAC AGACAAAGCC CATTTTCTT CCAAATGCAG AAGATGTAGA 180
TTGTGTGATG AAGGACATGG CTTAGAAGTG GAAATAAACT GCACCCGGAC CCAGAATACC 240
15 AAGTGCAGAT GTAAACCAAA CTTTTTTTGT AACTCTACTG TATGTGAACA CTGTGACCCT 300
TGCACCAAAT GTGAACATGG AATCATCAAG GAATGCACAC TCACCAGCAA CACCAAGTGC 360
AAAGAGGAAG GATCCAGATC TAACGAGCCC AAATCTTGTG ACAAACCTCA CACATGCCCC 420
CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAACCC 480
AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC 540
20 CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC 600
AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC 660

GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC 720
 CTTCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG 780
 GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC 840
 CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG 900
 5 GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC 960
 AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG 1020
 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA 1080

配列番号 : 1 5

配列の長さ : 1 5 7

10 配列の型 : アミノ酸

配列 :

Arg	Leu	Ser	Ser	Lys	Ser	Val	Asn	Ala	Gln	Val	Thr	Asp	Ile	Asn	Ser
1				5					10					15	
Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Glu	Thr	Gln	Asn
15				20					25					30	
Leu	Glu	Gly	Leu	His	His	Asp	Gly	Gln	Phe	Cys	His	Lys	Pro	Cys	Pro
				35				40					45		
Pro	Gly	Glu	Arg	Lys	Ala	Arg	Asp	Cys	Thr	Val	Asn	Gly	Asp	Glu	Pro
				50				55					60		
20	Asp	Cys	Val	Pro	Cys	Gln	Glu	Gly	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asp	Lys	Ala
				65				70					75		80

Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
 85 90 95
 Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
 100 105 110
 5 Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
 115 120 125
 Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
 130 135 140
 Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn
 10 145 150 155

配列番号 : 1 6

配列の長さ : 2 5 3 4

配列の型 : 核酸

配列の種類 : c D N A t o m R N A

15 配列 :

GACGCTTCTG GGGAGTGAGG GAAGCGGTTT ACGAGTGACT TGGCTGGAGC CTCAGGGGCG 60
 GGCAGTGGCA CGGAACACAC CCTGAGGCCA GCCCTGGCTG CCCAGGCGGA GCTGCCTCTT 120
 CTCCCGCGGG TTGGTGGACC CGCTCAGTAC GGAGTTGGGG AAGCTCTTTC ACTTCGGAGG 180
 ATTGCTCAAC AACCATGCTG GGCATCTGGA CCCTCCTACC TCTGGTTCTT ACGTCTGTTG 240
 20 CTAGATTATC GTCCAAAAGT GTTAATGCCC AAGTGACTGA CATCAACTCC AAGGGATTGG 300
 AATTGAGGAA GACTGTTACT ACAGTTGAGA CTCAGAACTT GGAAGGCCTG CATCATGATG 360

GCCAATTCTG CCATAAGCCC TGTCCTCCAG GTGAAAGGAA AGCTAGGGAC TGCACAGTCA 420
ATGGGGATGA ACCAGACTGC GTGCCCTGCC AAGAAGGGAA GGAGTACACA GACAAAGCCC 480
ATTTTCTTTC CAAATGCAGA AGATGTAGAT TGTGTGATGA AGGACATGGC TTAGAAGTGG 540
AAATAAACTG CACCCGGACC CAGAATACCA AGTGCAGATG TAAACCAAAC TTTTGTGTA 600
5 ACTCTACTGT ATGTGAACAC TGTGACCCTT GCACCAAATG TGAACATGGA ATCATCAAGG 660
AATGCACACT CACCAGCAAC ACCAAGTGCA AAGAGGAAGG ATCCAGATCT AACTTGGGGT 720
GGCTTTGTCT TCTTCTTTTG CCAATTCCAC TAATTGTTTG GGTGAAGAGA AAGGAAGTAC 780
AGAAAACATG CAGAAAGCAC AGAAAGGAAA ACCAAGGTTT TCATGAATCT CCAACCTTAA 840
ATCCTGAAAC AGTGGCAATA AATTTATCTG ATGTTGACTT GAGTAAATAT ATCACCCTA 900
10 TTGCTGGAGT CATGACACTA AGTCAAGTTA AAGGCTTTGT TCGAAGAAT GGTGTCAATG 960
AAGCCAAAAT AGATGAGATC AAGAATGACA ATGTCCAAGA CACAGCAGAA CAGAAAGTTC 1020
AACTGCTTCG TAATTGGCAT CAACTTCATG GAAAGAAAGA AGCGTATGAC ACATTGATTA 1080
AAGATCTCAA AAAAGCCAAT CTTTGTACTC TTGCAGAGAA AATTCAGACT ATCATCCTCA 1140
AGGACATTAC TAGTGAATCA GAAAATTCAA ACTTCAGAAA TGAATCCAA AGCTTGGTCT 1200
15 AGAGTGAAAA ACAACAAATT CAGTTCTGAG TATATGCAAT TAGTGTGTTGA AAAGATTCTT 1260
AATAGCTGGC TGTAAATACT GCTTGGTTTT TTAGTGGGTA CATTTTATCA TTTATTAGCG 1320
CTGAAGAGCC AACATATTTG TAGATTTTAA ATATCTCATG ATTCTGCCTC CAAGGATGTT 1380
TAAAATCTAG TTGGGAAAAC AAACCTCATC AAGAGTAAAT GCAGTGGCAT GCTAAGTACC 1440
CAAATAGGAG TGTATGCAGA GGATGAAAGA TTAAGATTAT GCTCTGGCAT CTAACATATG 1500
20 ATTCTGTAGT ATGAATGTAA TCAGTGTATG TTAGTACAAA TGTCTATCCA CAGGCTAACC 1560
CCACTCTATG AATCAATAGA AGAAGCTATG ACCTTTTGCT GAAATATCAG TTAGTGAACA 1620
GGCAGGCCAC TTTGCCTCTA AATTACCTCT GATAATTCTA GAGATTTTAC CATATTTCTA 1680

AAC TTT G T T T A T A A C T C T G A G A G A T C A T A T T T A T G T A A A G T A T A T G T A T T T G A G T G C A G 1740
A A T T T A A A T A A G G C T C T A C C T C A A A G A C C T T T G C A C A G T T T A T T G G T G T C A T A T T A T A C A 1800
A T A T T T C A A T T G T G A A T T C A C A T A G A A A A C A T T A A A T T A T A A T G T T T G A C T A T T A T A T A T 1860
G T G T A T G C A T T T A C T G G C T C A A A A C T A C C T A C T T C T T T C T C A G G C A T C A A A G C A T T T T 1920
5 G A G C A G G A G A G T A T T A C T A G A G C T T T G C C A C C T C C A T T T T G C C T T G G T G C T C A T C T T 1980
A A T G G C C T A A T G C A C C C C C A A C A T G G A A A T A T C A C C A A A A A T A C T T A A T A G T C C A C C A 2040
A A A G G C A A G A C T G C C C T T A G A A A T T C T A G C C T G G T T T G G A G A T A C T A A C T G C T C T C A G A G 2100
A A A G T A G C T T T G T G A C A T G T C A T G A A C C C A T G T T T G C A A T C A A A G A T G A T A A A T A G A T T 2160
C T T A T T T T T C C C C A C C C C G A A A A T G T T C A A T A A T G T C C A T G T A A A A C C T G C T A C A A A 2220
10 T G G C A G C T T A T A C A T A G C A A T G G T A A A A T C A T C A T C T G G A T T T A G G A A T T G C T C T T G T C A 2280
T A C C C T C A A G T T T C T A A G A T T A A G A T T C T C C T A C T A C T A T C C T A C G T T A A A T A T C T T 2340
T G A A A G T T T G T A T T A A T G T G A A T T T A A G A A A T A A T A T T A T A T T T C T G T A A A T G T A A A 2400
C T G T G A A G A T A G T T A T A A A C T G A A G C A G A T A C C T G G A A C C A C C T A A A G A A C T T C C A T T T A 2460
T G G A G G A T T T T T T G C C C C T T G T G T T T G G A A T T A T A A A A T A T A G G T A A A A G T A C G T A A T T 2520
15 A A A T A A T G T T T T T G 2534

配列番号 : 1 7

配列の長さ : 4 8 6

配列の型 : 核酸

配列の種類 : c D N A t o m R N A

20 配列 :

T T T C T T C C A T T C A G G T G T C G T G A G G A A T T C A C C A T G C T G G C A T C T G G A C C C T C C T A C 60

CTCTGGTTCT GACTAGTGT GCTACTCAGA ACTTGGAAGG CCTGCATCAT GATGGCCAAT 120
TCTGCCATAA GCCCTGTCCT CCAGGTGAAA GGAAAGCTAG GGAAGTGCACA GTCAATGGGG 180
ATGAACCAGA CTGCGTGCCC TGCCAAGAAG GGAAGGAGTA CACAGACAAA GCCCATTTTT 240
CTTCCAAATG CAGAAGATGT AGATTGTGTG ATGAAGGACA TGGCTTAGAA GTGGAAATAA 300
5 ACTGCACCCG GACCCAGAAT ACCAAGTGCA GATGTAAACC AAACTTTTTT TGTAAGTCTA 360
CTGTATGTGA AACTGTGAC CCTTGCACCA AATGTGAACA TGAATCATC AAGGAATGCA 420
CACTCACCAG CAACACCAAG TGCAAAGAGG AAGGATCCAG ATCTAACTAA TAGGGTACCT 480
TCTGAG 486

配列番号 : 1 8

10 配列の長さ : 1 1 8 2

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

TTTTCTTCCA TTTCAGGTGT CGTGAGGAAT TCACCATGCT GGGCATCTGG ACCCTCCTAC 60
15 CTCTGGTTCT GACTAGTGT GCTACTCAGA ACTTGGAAGG CCTGCATCAT GATGGCCAAT 120
TCTGCCATAA GCCCTGTCCT CCAGGTGAAA GGAAAGCTAG GGAAGTGCACA GTCAATGGGG 180
ATGAACCAGA CTGCGTGCCC TGCCAAGAAG GGAAGGAGTA CACAGACAAA GCCCATTTTT 240
CTTCCAAATG CAGAAGATGT AGATTGTGTG ATGAAGGACA TGGCTTAGAA GTGGAAATAA 300
ACTGCACCCG GACCCAGAAT ACCAAGTGCA GATGTAAACC AAACTTTTTT TGTAAGTCTA 360
20 CTGTATGTGA AACTGTGAC CCTTGCACCA AATGTGAACA TGAATCATC AAGGAATGCA 420
CACTCACCAG CAACACCAAG TGCAAAGAGG AAGGATCCAG ATCTAAGGAG CCCAAATCTT 480

GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG 540
TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA 600
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG 660
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT 720
5 ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA 780
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA 840
AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA 900
AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGCTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG 960
ACTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT 1020
10 CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG 1080
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA 1140
GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGATAGG GTACCTTCTG AG 1182

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 5 3 1

15 配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

TTTTCTTCCA TTTCAGGTGT CGTGAGGAAT TCACCATGCT GGGCATCTGG ACCCTCCTAC 60
CTCTGGTTCT GACTAGTGTC GCTACTCAGA ACTTGGAAGG CCTGCATCAT GATGGCCAAT 120
20 TCTGCCATAA GCCCTGTCCT CCAGGTGAAA GGAAAGCTAG GGAAGTGCACA GTCAATGGGG 180
ATGAACCAGA CTGCGTGCCC TGCCAAGAAG GGAAGGAGTA CACAGACAAA GCCCATTTTTT 240

WO 97/42319

PCT/JP97/01502

CTTCCAAATG CAGAAGATGT AGATTGTGTG ATGAAGGACA TGGCTTAGAA GTGGAAATAA 300
ACTGCACCCG GACCCAGAAT ACCAAGTGCA GATGTAAACC AAACTTTTTT TGTAACCTTA 360
CTGTATGTGA AACTGTGAC CCTTGCACCA AATGTGAACA TGAATCATC AAGGAATGCA 420
CACTCACCAG CAACACCAAG TGCAAAGAGG AAGGATCCAG ATCTAACGAG CCCAAATCTT 480
5 GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CATAGTGAGG TACCTTCTGA G 531

請求の範囲

1. F a s 抗原ポリペプチドのN末端アミノ酸残基から最もN末端よりのシステイン残基までのアミノ酸残基（該システイン残基は除く）のうち少なくとも1つのアミノ酸残基が欠失したF a s 抗原細胞外領域ポリペプチドの一部または全部を、少なくとも含有することを特徴とする新規F a s 抗原誘導体。

2. 前記少なくとも1つのアミノ酸残基が欠失したF a s 抗原細胞外領域ポリペプチドが、配列表の配列番号15のN末端から数えて1～42番目のアミノ酸残基のうち少なくとも1つが欠失したF a s 抗原細胞外領域ポリペプチドである請求項1に記載の新規F a s 抗原誘導体。

10 3. 前記アミノ酸残基が欠失したF a s 抗原細胞外領域ポリペプチドの欠失したアミノ酸残基数が29以上である請求項1または2に記載の新規F a s 抗原誘導体。

4. F a s 抗原ポリペプチドのN末端アミノ酸残基から最もN末端よりのシステイン残基までのアミノ酸残基（該システイン残基は除く）のうち少なくとも1つのアミノ酸残基が欠失したF a s 抗原細胞外領域ポリペプチドの一部または全部からなるポリペプチド

または、

該ポリペプチドを少なくとも含有し、さらにF a s 抗原膜貫通領域および／またはF a s 抗原細胞内領域の1部または全部を含有するポリペプチドからなる群から選択される、F a s 抗原の1または2以上の部分からなる新規F a s 抗原変異体

20 である請求項1～3のいずれかに記載の新規F a s 抗原誘導体。

5. 請求項 4 に記載の新規 F a s 抗原変異体にさらに F a s 抗原以外の (ポリ) ペプチドを含有する融合ポリペプチドである請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の新規 F a s 抗原誘導体。
6. 請求項 5 に記載の融合ポリペプチドの C 末端側に下記 a および b からなる
- 5 群から選択される少なくとも 1 つの (ポリ) ペプチドを含有する請求項 5 に記載の新規 F a s 抗原誘導体。
- a. イムノグロブリンのヒンジ領域の 1 部または全部。
- b. イムノグロブリンの F c 断片の 1 部または全部。
7. 請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の新規 F a s 抗原誘導体の多量体である新
- 10 規 F a s 抗原誘導体。
8. 請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする DNA 配列を含有することを特徴とする DNA。
9. 配列表の配列番号 1 2 ~ 1 4 のいずれかに記載の DNA 配列を含有する請求項 8 に記載の DNA。
- 15 1 0. 請求項 8 または 9 に記載の DNA 配列を含有することを特徴とする組み換え DNA 分子。
- 1 1. 請求項 1 0 に記載の組み換え DNA 分子で形質転換されたことを特徴とする形質転換体。
- 1 2. 請求項 1 1 に記載の形質転換体を培養し、該培養混合物から請求項 1 ~
- 20 7 のいずれかに記載の新規 F a s 抗原誘導体を回収、精製する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の新規 F a s 抗原誘導体の製造方法。

13. 請求項1～7のいずれかに記載の新規F a s 抗原誘導体またはその生理的に許容されうる塩を有効成分として含有する医薬。

14. F a s 抗原ポリペプチドのN末端アミノ酸残基から最もN末端よりのシステイン残基までのアミノ酸残基（該システイン残基は除く）のうち少なくとも

5 1つを欠失させることを特徴とする、F a s 抗原またはF a s 抗原誘導体の活性または機能を改良する方法。

FIG. 1-1

GACGCTTCTGGGGAGTGAGGGAAGCGTTTACGAGTGA

50

100

CCTGGAGCCTCAGGGGCGGGCACTGGCACGGAACACACCCTGAGGCCAGCCCTGGCTGCCAGGCGGAGCTGCCTC

150

TTCTCCGCGGGTTGGTGGACCCGCTCAGTACGGAGTTGGGAAGCTCTTCACTTCGGAGGATTGCTCAACAACC

200

250

ATG CTG GGC ATC TGG ACC CTC CTA CCT CTG GTT CTT ACG TCT GTT GCT AGA TTA TCG
Met Leu Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala Arg Leu Ser

-10

-1 +1

300

TCC AAA AGT GTT AAT GCC CAA GTG ACT GAC ATC AAC TCC AAG GGA TTG GAA TTG AGG
Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser Lys Gly Leu Glu Leu Arg

10

20

350

AAG ACT GTT ACT ACA GTT GAG ACT CAG AAC TTG GAA GGC CTG CAT CAT GAT GGC CAA
Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln

30

40

1/15

差替え用紙 (規則26)

FIG. 1 - 2

400

TTC TGC CAT AAG CCC TGT CCT CCA GGT GAA AGG AAA GCT AGG GAC TGC ACA GTC AAT
Phe Cys His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn

50

60

450

GGG GAT GAA CCA GAC TGC GTG CCC TGC CAA GAA GGG AAG GAG TAC ACA GAC AAA GCC
Gly Asp Glu Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala

70

500

CAT TTT TCT TCC AAA TGC AGA AGA TGT AGA TTG TGT GAT GAA GGA CAT GGC TTA GAA
His Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu Glu

80

90

550

GTG GAA ATA AAC TGC ACC CGG ACC CAG AAT ACC AAG TGC AGA TGT AAA CCA AAC TTT
Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe

100

*

110

600

650

TTT TGT AAC TCT ACT GTA TGT GAA CAC TGT GAC CCT TGC ACC AAA TGT GAA CAT GGA
Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly

120

130

*

1/1/15

差替え用紙(規則26)

FIG. 1 - 3

700
ATC ATC AAG GAA TGC ACA CTC ACC AGC AAC ACC AAG TGC AAA GAG GAA GGA TCC AGA
Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr Leu Thr Ser Asn Thr Lys Glu Glu Gly Ser Arg
140 150
750
TCT AAC TTG GGG TGG CTT TGT CTT CTT CTT TTG CCA ATT CCA CTA ATT GTT TGG GTG
Ser Asn Leu Gly Trp Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val
160 170
800
AAG AGA AAG GAA GTA CAG AAA ACA TGC AGA AAG CAC AGA AAG GAA AAC CAA GGT TCT
Lys Arg Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly Ser
180 190
850
CAT GAA TCT CCA ACC TTA AAT CCT GAA ACA GTG GCA ATA AAT TTA TCT GAT GTT GAC
His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu Ser Asp Val Asp
200 210
900
TTG AGT AAA TAT ATC ACC ACT ATT GCT GGA GTC ATG ACA CTA AGT CAA GTT AAA GGC
Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly
220 230

1/2/15

差替え用紙(規則26)

FIG. 1-4

950

TTT GTT CGA AAG AAT GGT GTC AAT GAA GCC AAA ATA GAT GAG ATC AAG AAT GAC AAT
Phe Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp Asn

240

250

1000

GTC CAA GAC ACA GCA GAA CAG AAA GTT CAA CTG CTT CGT AAT TGG CAT CAA CTT
Val Gln Asp Thr Ala Glu Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp His Gln Leu

260

1050

CAT GGA AAG AAA GAA GCG TAT GAC ACA TTG ATT AAA GAT CTC AAA AAA
His Gly Lys Lys Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys

270

280

FIG. 2-1

1100 1150
GCC AAT CTT TGT ACT CTT GCA GAG AAA ATT CAG ACT ATC ATC CTC AAG GAC ATT ACT
Ala Asn Leu Cys Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr
290 300
1200
AGT GAC TCA GAA AAT TCA AAC TTC AGA AAT GAA ATC CAA AGC TTG GTC TAG AGTGAAA
Ser Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn Glu Ile Gln Ser Leu Val End
310
1250
AACAACAAATTCAGTTCTGAGTATATGCAATTAGTGTGTTGAAAAGATTCTTAATAGCTGGCTGTAAATACTGCTTG
1300 1350
GTTTTTTACTGGGTACATTTTATCATTATTAGCGCTGAAGAGCCAACATATTTGTAGATTTTAAATATCTCATGA
1400
TTCTGCCTCCAAGGATGTTTAAATCTAGTTGGGAAAACAACTTCATCAAGAGTAAATGCAGTGGCATGCTAAGT
1450 1500
ACCCAAATAGGAGTGTATGCAGAGGATGAAAGATTAAGATTATGCTCTGCCATCTAACATATGATTCTGTAGTATG

FIG. 2 - 2

1550

AATGTAATCAGTGTATGTTAGTACAAATGTCTATCCACAGGCTAACCCCACTCTATGAATCAATAGAAGAAGCTAT

1600

1650

GACCTTTTGCTGAAATATCAGTTACTGAACAGGCAGGCCACTTTGCCTCTAAATTACCTCTGATAATTCTAGAGAT

1700

TTTACCATATTTCTAAACTTTGTTTATAACTCTGAGAAGATCATATTTATGTAAAGTATATGTATTTGAGTGCAGA

1750

1800

ATTTAAATAAGGCTCTACCTCAAAGACCTTTGCACAGTTTATTGGTGCATATTATACAATATTTCAATTGTGAAT

1850

TCACATAGAAAACATTAAATTATAATGTTTGACTATTATATATGTGTATGCATTTTACTGGCTCAAACTACCTAC

1900

1950

TTCTTTCTCAGGCATCAAAAGCATTTTGAGCAGGAGAGTATTACTAGAGCTTTGCCACCTCTCCATTTTGCCTTG

2/1/15

差替え用紙 (規則26)

FIG. 2 - 3

2000

GTGCTCATCTTAATGGCCTAATGCACCCCCAAACATGGAAATATCACCAAAAAATACTTAATAGTCCACCAAAAGG

2050

2100

CAAGACTGCCCTTAGAAATTCTAGCCTGGTTTGGAGATACTAACTGCTCTCAGAGAAAGTAGCTTTGTGACATGTC

2150

ATGAACCCATGTTTGAATCAAAGATGATAAAATAGATTCTTATTTTCCCCACCCCCGAAAATGTTCAATAATG

2200

2250

TCCCATGTAAACCTGCTACAAATGGCAGCTTATACATAGCAATGGTAAATCATCATCTGGATTAGGAATTG

2300

CTCTTGTACATACCCTCAAGTTTCTAAGATTTAAGATTCTCCTTACTACTATCCTACGTTTAAATATCTTTGAAAGT

2350

2400

TTGTATTAAATGTGAATTTAAGAAATAATATTTATATTTCTGTAAATGTAACTGTGAAGATAGTTATAAACT

FIG. 2-4

2450

GAAGCAGATACCTGGAACCACTAAAGAACTTCCATTTATGGAGGATTTTTTGGCCCTTGTGTTTGAATTATAA

2500

AATATAGGTAAAAGTACGTAATTAAATAATGTTTTG

FIG. 3-1

ttttcttccatttcaggtgtcgtgaggaattcacc

50

ATG	CTG	GGC	ATC	TGG	ACC	CTC	CTA	CCT	CTG
Met	Leu	Gly	Ile	Trp	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu

hFas antigen signal peptide -10

GTT	CTG	ACT	AGT	GTC	GCT	ACT	CAG	AAC	TTG
Val	Leu	Thr	Ser	Val	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu

-1

1

100

hFas (nd29)

GAA	GGC	CTG	CAT	CAT	GAT	GGC	CAA	TTC	TGC
Glu	Gly	Leu	His	His	Asp	Gly	Gln	Phe	Cys

10

150

CAT	AAG	CCC	TGT	CCT	CCA	GGT	GAA	AGG	AAA
His	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Lys

GCT	AGG	GAC	TGC	ACA	GTC	AAT	GGG	GAT	GAA
Ala	Arg	Asp	Cys	Thr	Val	Asn	Gly	Asp	Glu

200

CCA	GAC	TGC	GTG	CCC	TGC	CAA	GAA	GGG	AAG
Pro	Asp	Cys	Val	Pro	Cys	Gln	Glu	Gly	Lys

GAG	TAC	ACA	GAC	AAA	GCC	CAT	TTT	TCT	TCC
Glu	Tyr	Thr	Asp	Lys	Ala	His	Phe	Ser	Ser

50

250

AAA	TGC	AGA	AGA	TGT	AGA	TTG	TGT	GAT	GAA
Lys	Cys	Arg	Arg	Cys	Arg	Leu	Cys	Asp	Glu

FIG. 3-2

300
 GGA CAT GGC TTA GAA GTG GAA ATA AAC TGC
 Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys
 *

ACC CGG ACC CAG AAT ACC AAG TGC AGA TGT
 Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys

350
 AAA CCA AAC TTT TTT TGT AAC TCT ACT GTA
 Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val
 *

TGT GAA CAC TGT GAC CCT TGC ACC AAA TGT
 Cys Glu His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys
 100

400
 GAA CAT GGA ATC ATC AAG GAA TGC ACA CTC
 Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu

450
 ACC AGC AAC ACC AAG TGC AAA GAG GAA GGA
 Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly

TCC AGA TCT AAC TAA TAG ggtaccttctgag
 Ser Arg Ser Asn *** ***

FIG. 4-1

ttttcttccatttcaggtgtcgtgaggaattcacc

50

ATG	CTG	GGC	ATC	TGG	ACC	CTC	CTA	CCT	CTG
Met	Leu	Gly	Ile	Trp	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu

-10

hFas antigen signal peptide

GTT	CTG	ACT	AGT	GTC	GCT	ACT	CAG	AAC	TTG
Val	Leu	Thr	Ser	Val	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu

-1

1

100

→ hFas (nd29)

GAA GGC CTG CAT CAT GAT GGC CAA TTC TGC
Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys

150

CAT AAG CCC TGT CCT CCA GGT GAA AGG AAA
His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys

GCT AGG GAC TGC ACA GTC AAT GGG GAT GAA
Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu

200

CCA GAC TGC GTG CCC TGC CAA GAA GGG AAG
Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys

GAG TAC ACA GAC AAA GCC CAT TTT TCT TCC
Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His Phe Ser Ser

50

250

AAA TGC AGA AGA TGT AGA TTG TGT GAT GAA
Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu

FIG. 4-2

300

GGA CAT GGC TTA GAA GTG GAA ATA AAC TGC
 Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys
 *

ACC CGG ACC CAG AAT ACC AAG TGC AGA TGT
 Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys

350

AAA CCA AAC TTT TTT TGT AAC TCT ACT GTA
 Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val
 *

TGT GAA CAC TGT GAC CCT TGC ACC AAA TGT
 Cys Glu His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys

100

400

GAA CAT GGA ATC ATC AAG GAA TGC ACA CTC
 Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu

450

ACC AGC AAC ACC AAG TGC AAA GAG GAA GGA
 Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly

TCC AGA TCT AAC GAG CCC AAA TCT TGT GAC
 Ser Arg Ser Asn Glu Pro Lys Ser Cys Asp

500

AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

hIgG1 Fc

4/1/15

差替え用紙 (規則26)

FIG. 4-3

CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
150

550

CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

600

ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

650

GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
200

700

CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

750

GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

4/2/15

差 替 え 用 紙 (規則26)

FIG. 4-4

GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

800

AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
250

850

CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

900

CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

950

TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
300

4/3/15

差替え用紙 (規則26)

FIG. 4-5

1000
AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

1050
GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

1100
GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
350

1150
TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA TAG ggtacc
Ser Leu Ser Pro Gly Lys *** **

ttctgag

FIG. 5-1

ttttcttccatttcaggtgtcgtgaggaattcacc

50

ATG	CTG	GGC	ATC	TGG	ACC	CTC	CTA	CCT	CTG
Met	Leu	Gly	Ile	Trp	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu

-10

hFas antigen signal peptide

GTT	CTG	ACT	AGT	GTC	GCT	ACT	CAG	AAC	TTG
Val	Leu	Thr	Ser	Val	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu

-1

1

100

hFas (nd29)

GAA GGC CTG CAT CAT GAT GGC CAA TTC TGC
Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys

150

CAT AAG CCC TGT CCT CCA GGT GAA AGG AAA
His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys

GCT AGG GAC TGC ACA GTC AAT GGG GAT GAA
Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu

200

CCA GAC TGC GTG CCC TGC CAA GAA GGG AAG
Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys

GAG TAC ACA GAC AAA GCC CAT TTT TCT TCC
Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His Phe Ser Ser

50

250

AAA TGC AGA AGA TGT AGA TTG TGT GAT GAA
Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu

FIG. 5-2

300

GGA CAT GGC TTA GAA GTG GAA ATA AAC TGC
 Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys
 *

ACC CGG ACC CAG AAT ACC AAG TGC AGA TGT
 Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys

350

AAA CCA AAC TTT TTT TGT AAC TCT ACT GTA
 Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val
 *

TGT GAA CAC TGT GAC CCT TGC ACC AAA TGT
 Cys Glu His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys

100

400

GAA CAT GGA ATC ATC AAG GAA TGC ACA CTC
 Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu

450

ACC AGC AAC ACC AAG TGC AAA GAG GAA GGA
 Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly

TCC AGA TCT AAC GAG CCC AAA TCT TGT GAC
 Ser Arg Ser Asn Glu Pro Lys Ser Cys Asp

500

AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA TAG
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro ***

hIgG1 hinge

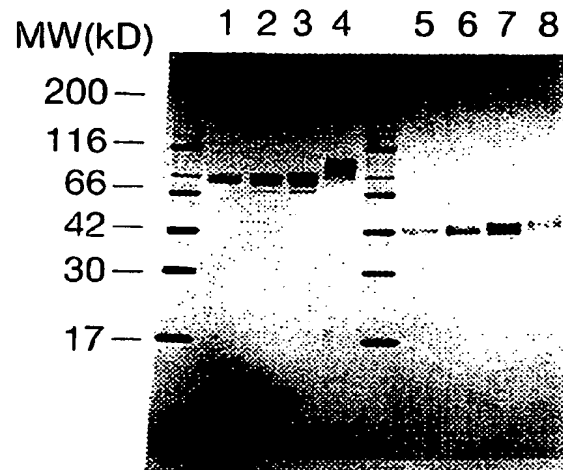
FIG. 5-3

TGA ggtaccttctgag

5/2/15

差替え用紙 (規則26)

FIG. 6



(非還元条件)

Lane 1 ~ 3 : shFas (nd29) - Fc

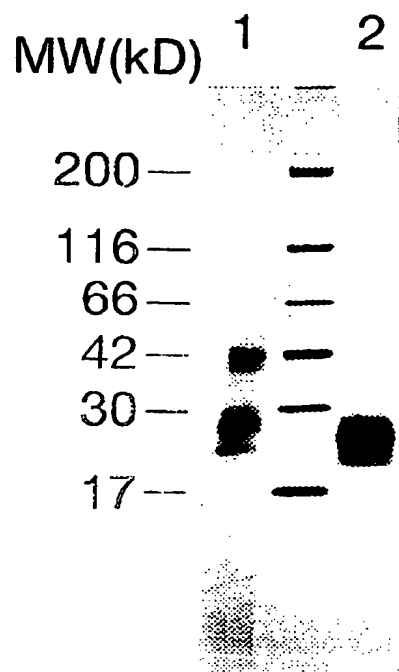
Lane 4 : hFas - Fc

(還元条件)

Lane 5 ~ 7 : shFas (nd29) - Fc

Lane 8 : hFas - Fc

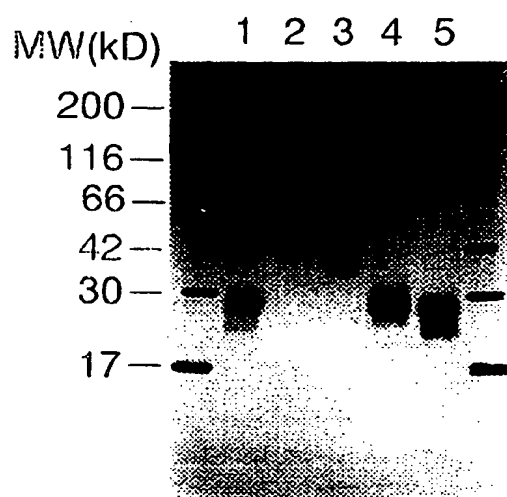
FIG. 7



L a n e 1 : 非還元条件

L a n e 2 : 還元条件

FIG. 8



(非還元条件)

Lane 1 : ゲル濾過分離前試料

Lane 2 : フラクション 1

Lane 3 : フラクション 2

Lane 4 : フラクション 3

Lane 5 : フラクション 4

FIG. 9

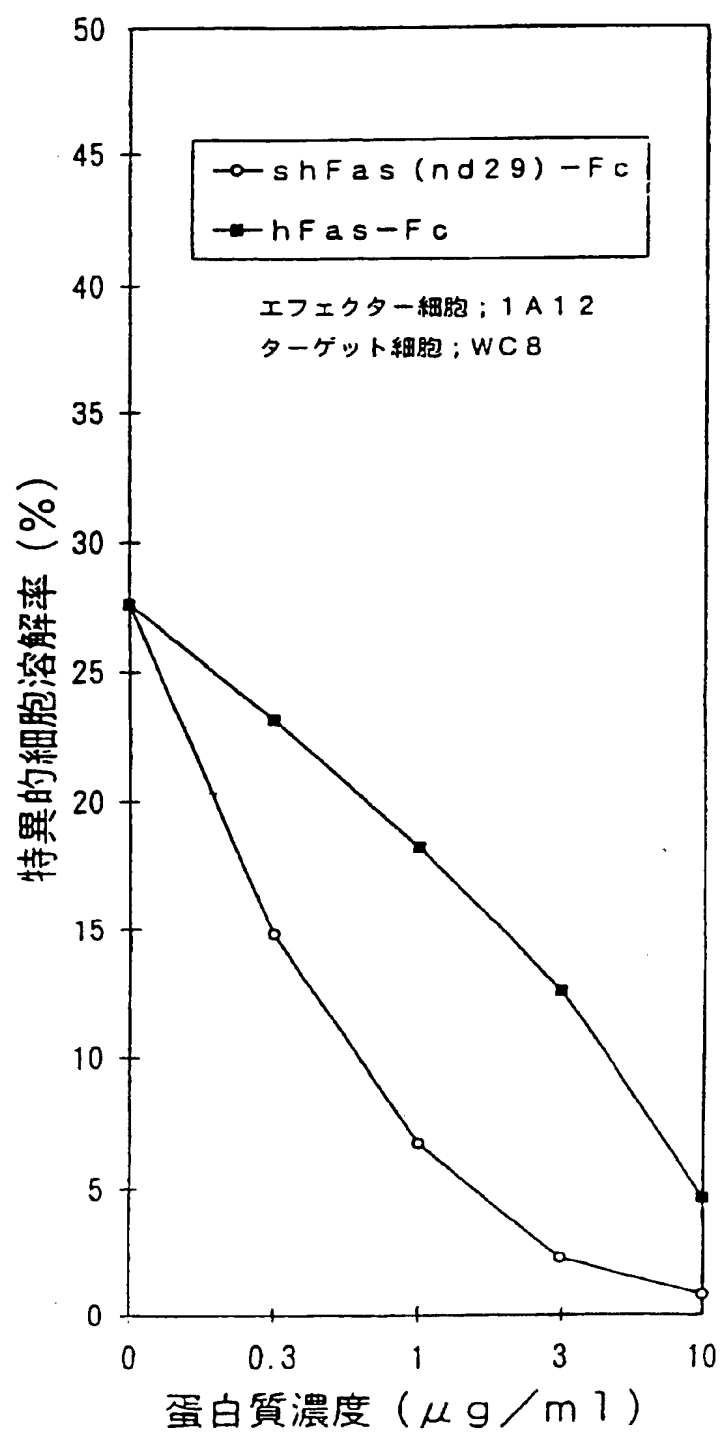


FIG. 10

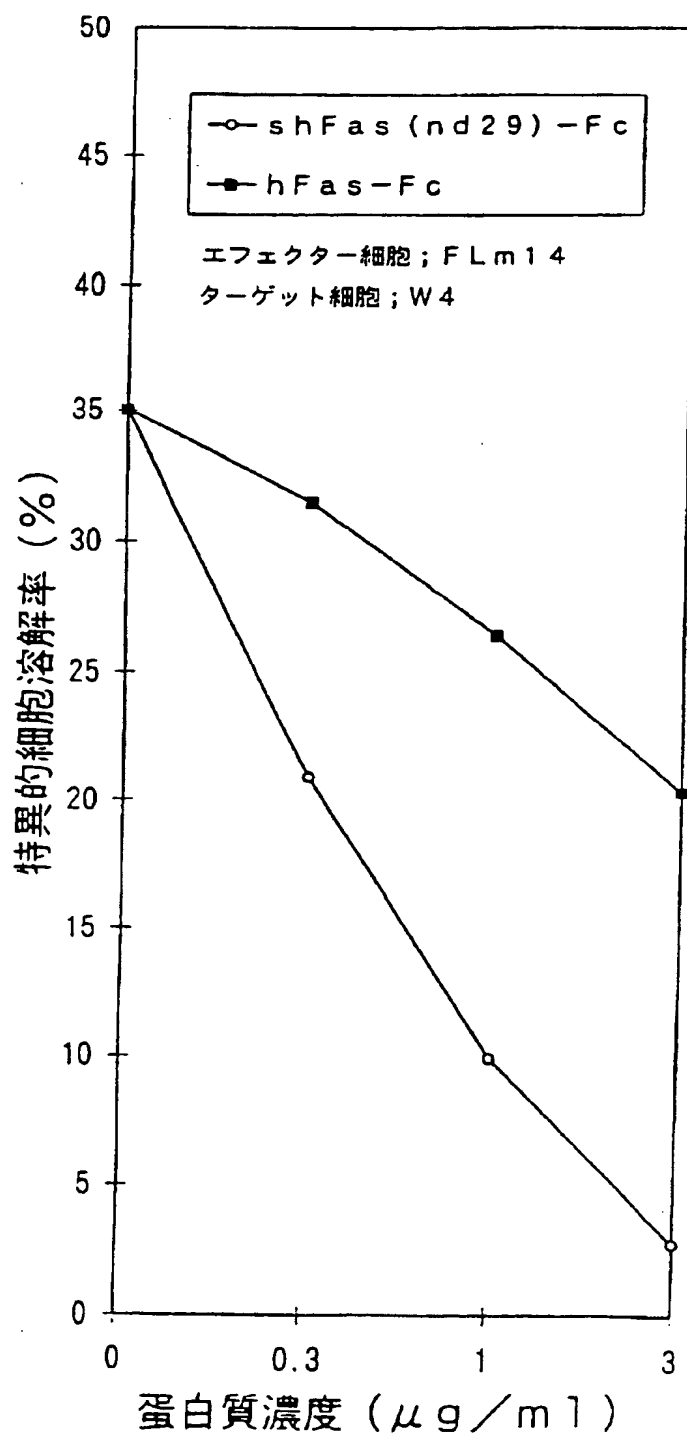


FIG. 11

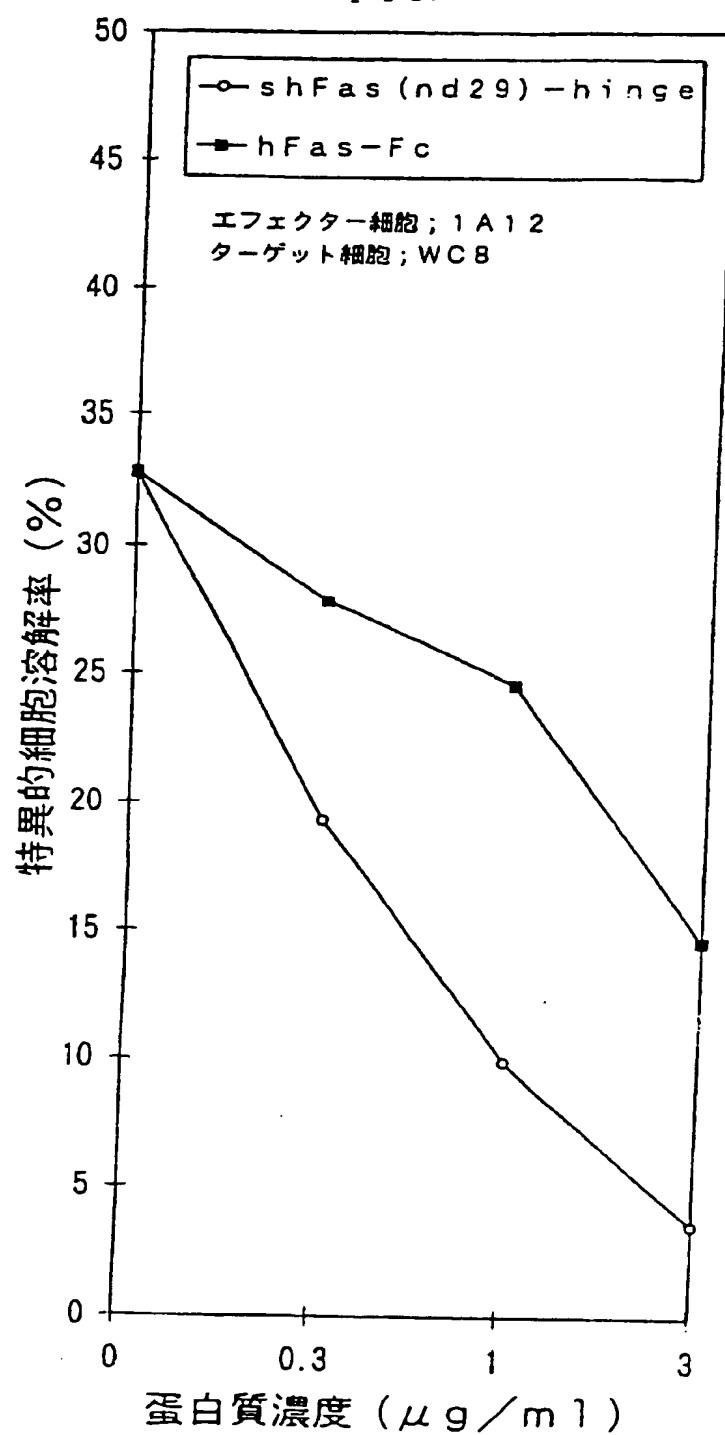


FIG. 12

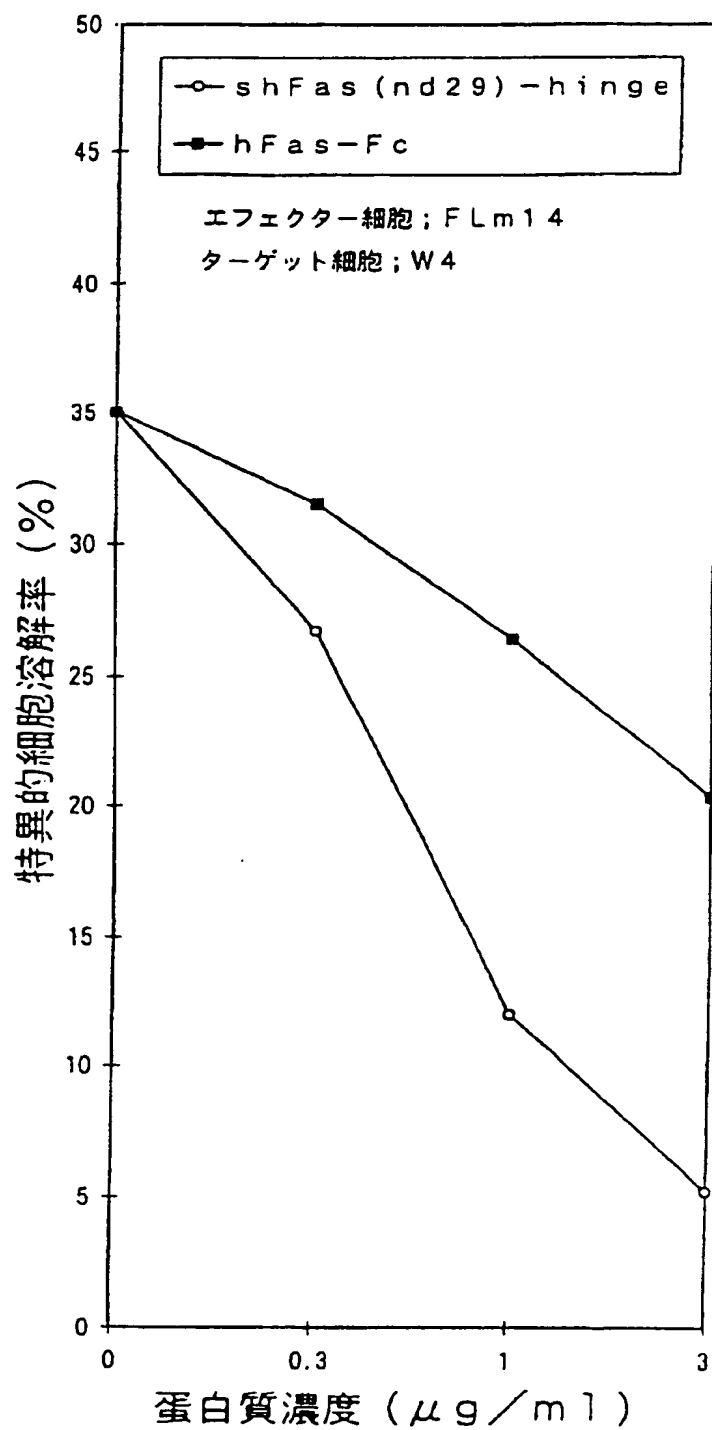


FIG. 13

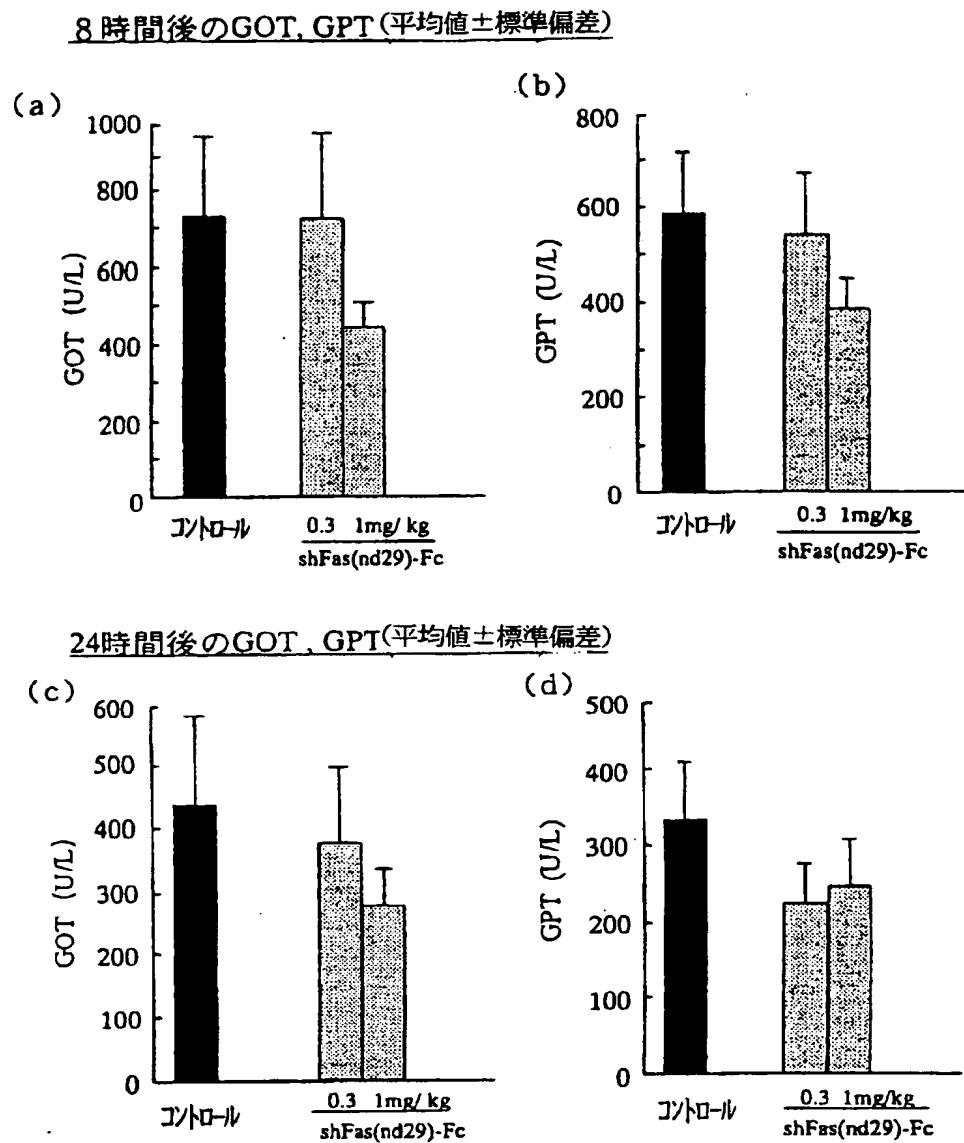


FIG. 14

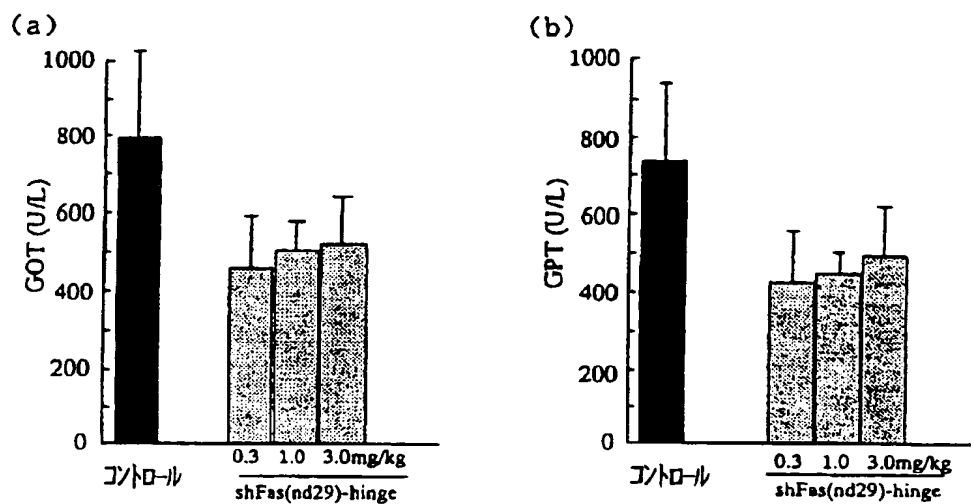
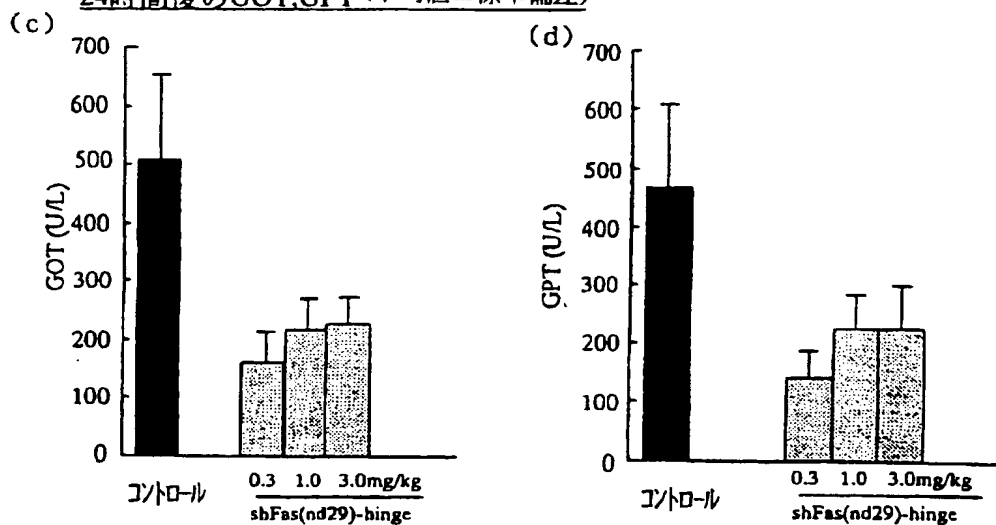
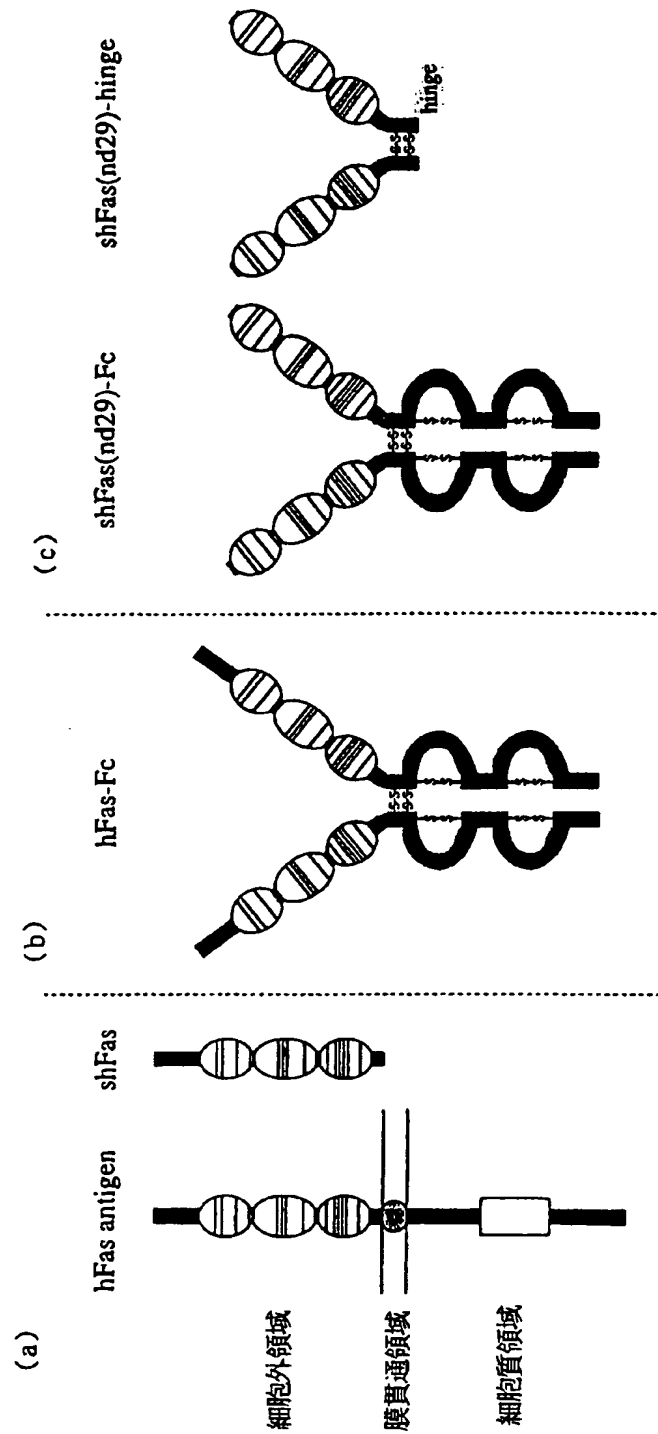
8時間後のGOT,GPT (平均値±標準偏差)24時間後のGOT,GPT (平均値±標準偏差)

FIG. 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N15/62, C07K14/47, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N15/62, C07K14/47, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPI,L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Cell 66 1991 Naoto Itoh et al. "The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis" p. 233-243	1 - 14
Y	The EMBO J. 14(6) 1995 Masato Tanaka et al. "Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes" p. 1129-1135	1 - 14
Y	WO, 9513293, A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), May 18, 1995 (18. 05. 95) & EP, 675200, A & JP, 8-127594, A	1 - 14
A	JP, 7-289266, A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), November 7, 1995 (07. 11. 95) (Family: none)	1 - 14
Y	JP, 7-69914, A (Bristol-Myers Squibb Co.), March 14, 1995 (14. 03. 95) & EP, 613944, A	5 - 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 24, 1997 (24. 07. 97)

Date of mailing of the international search report

August 5, 1997 (05. 08. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01502

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 5-503009, A (Genentech Inc.), May 27, 1993 (27. 05. 93) & EP, 526452, A & WO, 9108298, A	5 - 7
A	Eur. J. Immunol. 24 1994 David H. Lynch et al. "gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas" p. 928-933	1 - 14
Y	"Nikkei Baio Saishin-Yogo Jiten '91 (in Japanese)" edited by Nikkei Baioteku (Nikkei BP sha) 1991, p. 550	1 - 14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Intcl [*] C12N15/12, C12N15/62, C07K14/47, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/16		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Intcl [*] C12N15/12, C12N15/62, C07K14/47, C12P21/02, C12N1/21, A61K38/16		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ON LINE, BIOSIS, WPI/WPI.L		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Cell 66 1991 Naoto Itoh et al. 「The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis」 p.233-243	1-14
Y	The EMBO J. 14(6) 1995 Masato Tanaka et al. 「Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes」 p.1129-1135	1-14
Y	WO, 9513293, A (持田製薬株式会社) 18. 5月 1995 (18. 05. 95) & EP, 675200, A & JP, 8-127594, A	1-14
A	JP, 7-289266, A (持田製薬株式会社) 7. 11月 1995 (07. 11. 95) (Family:none)	1-14
Y	JP, 7-69914, A (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO) 14. 3月 1995 (14. 03. 95) & EP, 613944, A	5-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 24. 07. 97	国際調査報告の発送日 05.08.97	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3449	4B 9359